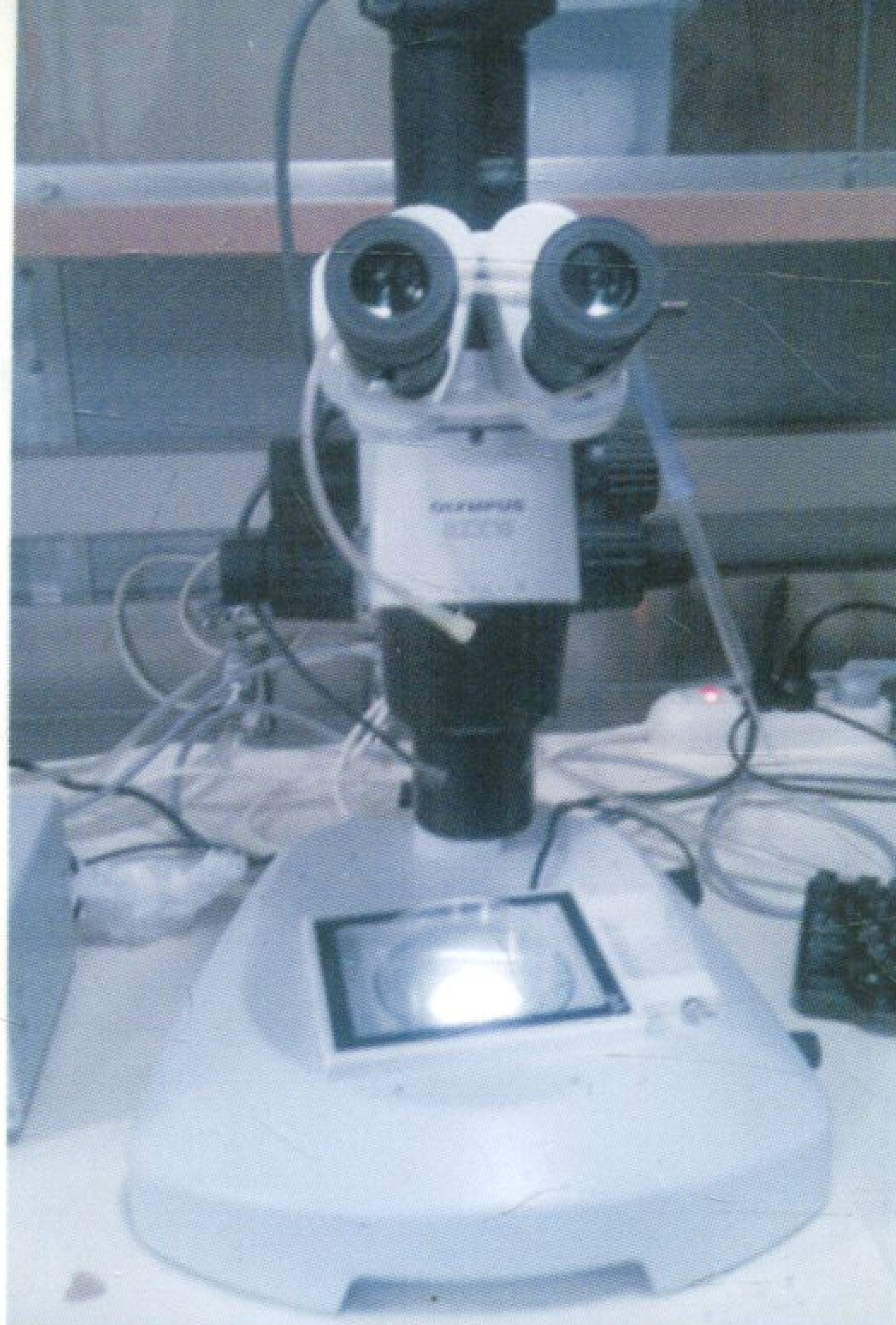
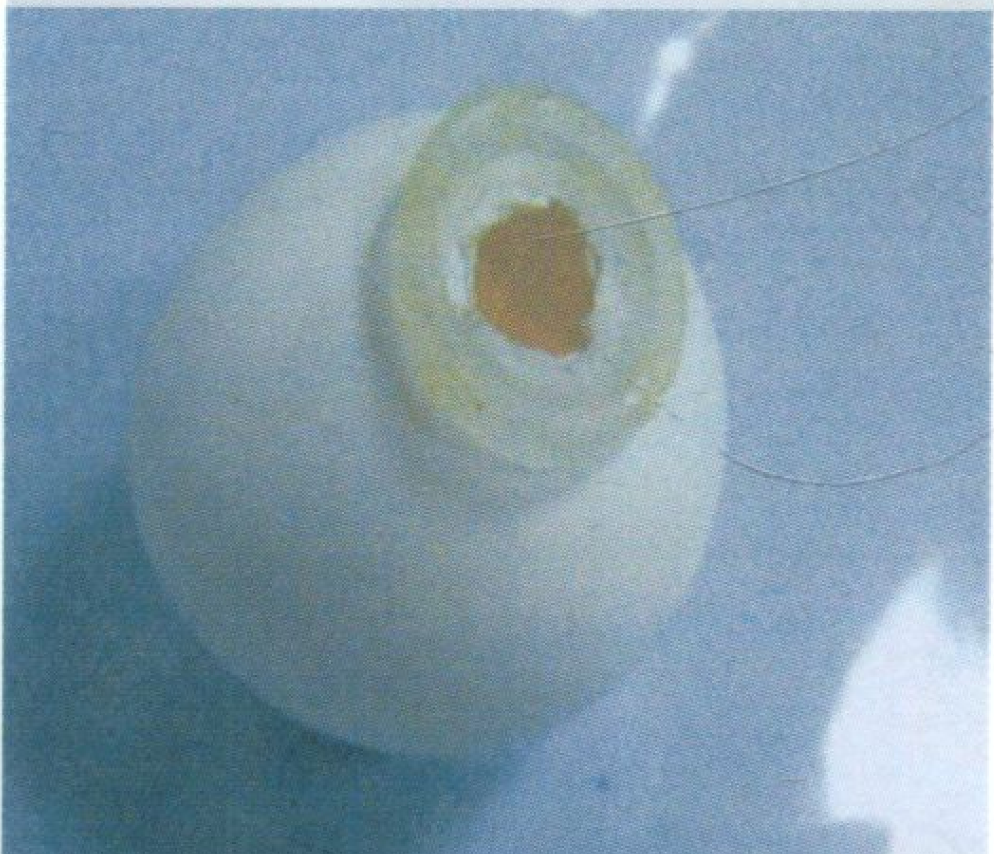
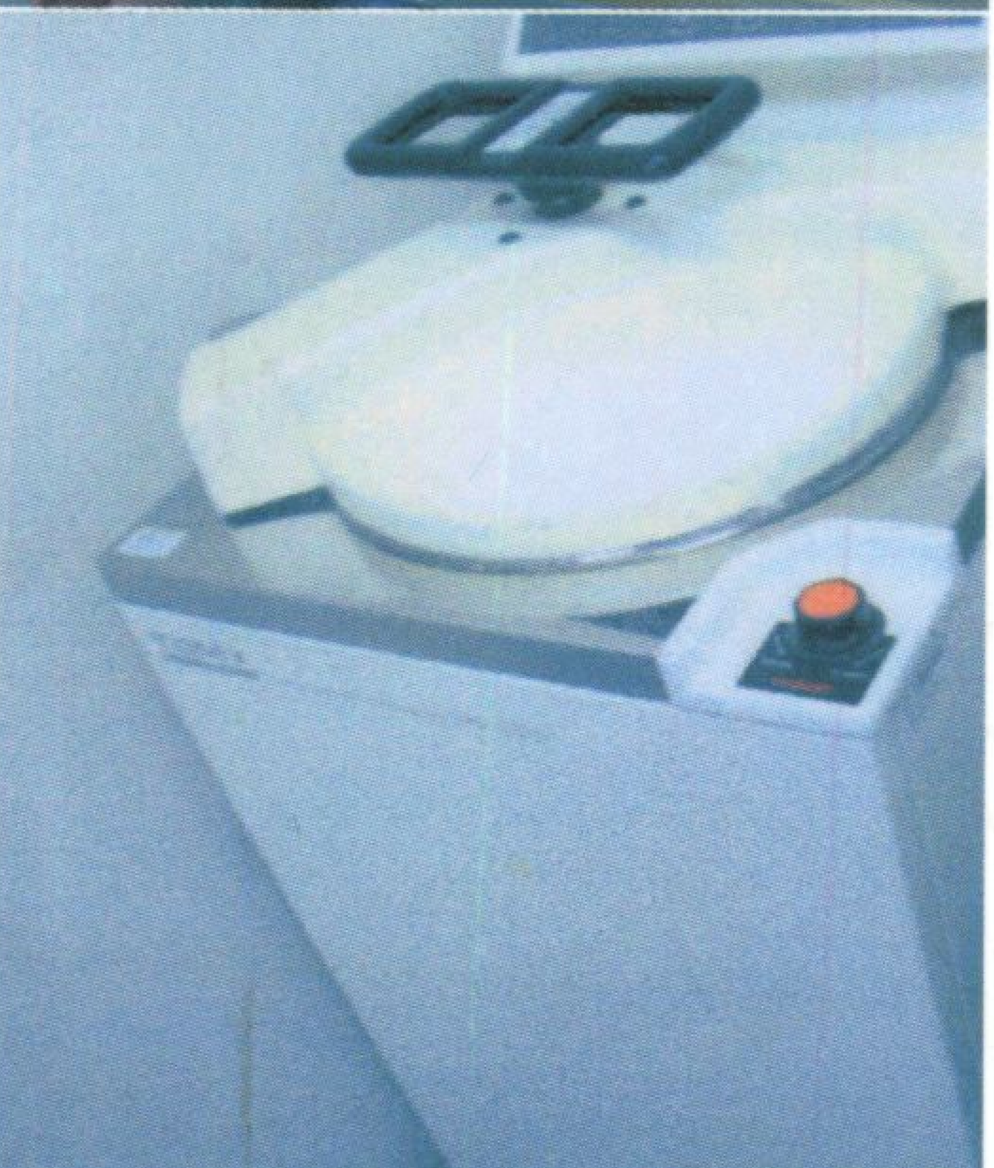







تقنيات عملية على أجنة الفقاريات

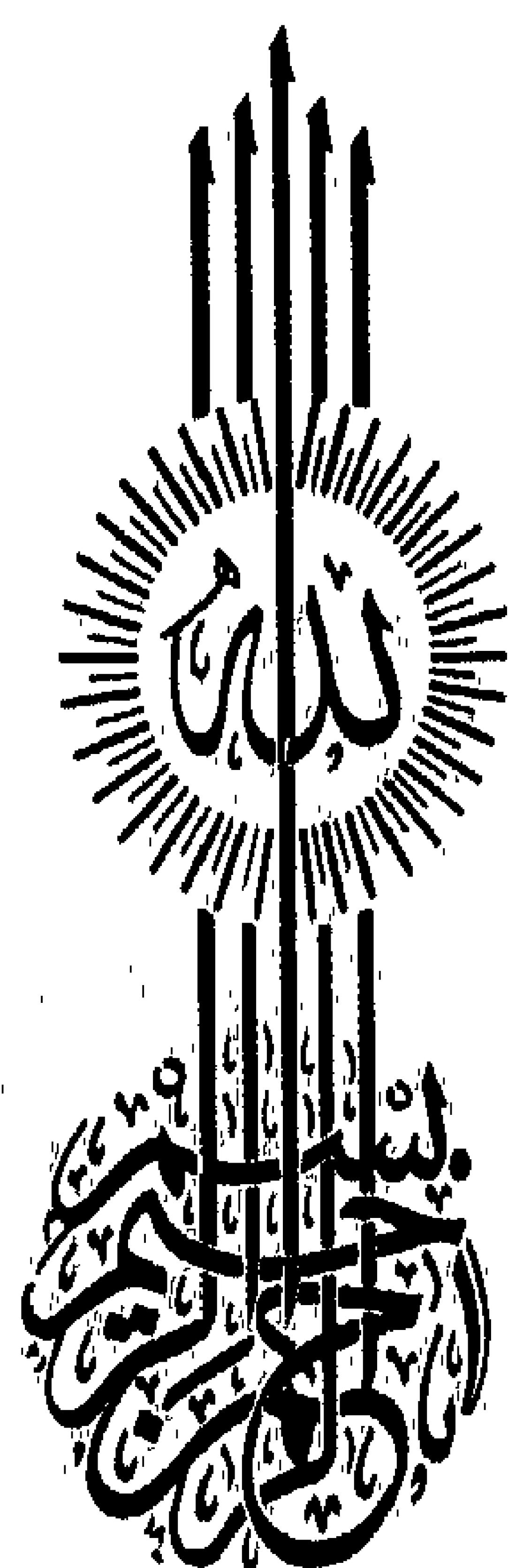
تأليف

أ.د.أحمد بن راشد الحميدي



جامعة الملك سعود
النشر العلمي والمطابع




بسم الله الرحمن الرحيم

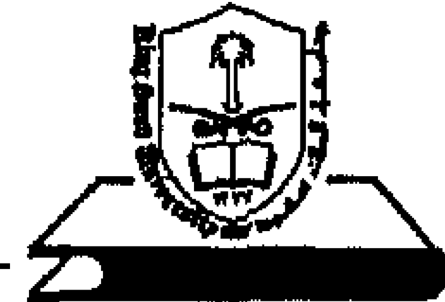
تقنيات عملية على أجنة الفقاريات

تأليف

أ.د. أحمد بن راشد الحميدي

أستاذ علم الأجنة التجريبي

قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة الملك سعود



النشر العلمي والمطابع - جامعة الملك سعود

ص.ب ٦٨٩٥٣ - الرياض ١١٥٣٧ - المملكة العربية السعودية

فهرسة مكتبة الملك فهد الوطنية أثناء النشر

الحميدي، أحمد راشد

تقنيات عملية على أجنة الفقاريات./ أحمد راشد الحميدي.- الرياض، ١٤٣٣هـ

٢٣٢ص؛ ١٧×٢٤سم

ردمك: ١-٠٥٩-٥٠٧-٦٠٣-٩٧٨

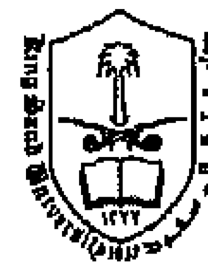
١- الفقاريات ٢- علم الأجنة أ. العنوان

ديوي ٥٩٦,٠٣ ١٤٣٣/٧٧٨٨

رقم الإيداع: ١٤٣٣/٧٧٨٨

ردمك: ١-٠٥٩-٥٠٧-٦٠٣-٩٧٨

حكمت هذا الكتاب لجنة متخصصة، وقد وافق المجلس العلمي على نشره في اجتماعه السادس عشر للعام الدراسي ١٤٣٢/ ١٤٣٣هـ المعقود بتاريخ ٢٣/ ٥/ ١٤٣٣هـ الموافق ١٥/ ٤/ ٢٠١٢م.



النشر العلمي والمطابع ١٤٣٣هـ

إهداء

إلى كل من نطق بحرف الألف والباء
إلى كل طلاب مرحلة البكالوريوس والدراسات العليا
إلى كل الباحثين والباحثات في مجال علم الأجنة التجريبي.
أهدي هذا الكتاب فهو خلاصة خبراتي
وأسفاري وعصارة جهـدي وأفكاري.

المؤلف

شكر وتقدير

لايسعني إلا أن أتوجه بالشكر الجزيل للمجلس العلمي بجامعة الملك سعود لدعمه وتبنيه مثل هذه الكتب والإنتاج العلمي بالجامعة، كما يطيب لي أن أتوجه بالشكر الجزيل لمجلس كلية العلوم وقسم علم الحيوان لمساندتهم ودفعهم لي لتأليف مثل هذا الكتاب. كما أشكر سعادة د. إبراهيم بركات على مراجعته وملاحظاته على الكتاب. وأرجو من المولى العلي القدير أن يتقبل مني عملي هذا، ويجعله خالصا لوجهه الكريم، وما توفيقي إلا بالله فهو القادر على ذلك ونعم المعين .

المؤلف

أحمد بن راشد الحميدي

ص . ب.٢٤٥٥ الرياض ١١٤٥١

ahimaidi@ksu.edu.sa.

هاتف: ٩٦٦١-٤٦٧٥٧٨٦ فاكس ٤٦٧٨٥١٤

المقدمة

الحمد لله رب العالمين، والصلاة والسلام على المبعوث رحمة للعالمين، نبينا محمد عليه أفضل الصلاة والسلام وعلى آله وصحبه أجمعين.

يطيب لي عزيزي القارئ أن أضع بين يديك هذا الكتاب العملي لأجنة الفقاريات التجريبي إسهاما مني، أولا في إثراء المكتبة العربية بالمراجع فيما يتعلق بالدروس المعملية نظرا لقلتها، محتفظا بالمصطلحات العلمية باللغة الإنجليزية ليسهل الرجوع إليها في المراجع الأجنبية. فقد وضعت خلاصة خبراتي التي اكتسبتها خلال السنوات الماضية ليستفيد منها كل من يرغب بالتبحر والتعلم بشكل عملي في علم الأجنة التجريبي من التجارب البسيطة والسهلة والتي يمكن إجراؤها في أبسط التجهيزات المعملية وحتى التجارب التطبيقية العملية المتقدمة التي تصلح للباحثين وطلاب الدراسات العليا مثل إنتاج الخلايا الجذعية والاستنساخ ودمج الأجنة. فقد جمعت مادة هذا الكتاب بحيث يسهل على الدارس والقارئ الاستفادة منها. فقد جعلت الكتاب على شكل دروس عملية منفصلة لكل من أجنة البرمائيات ومثالها الضفدعة، والطيور ومثالها الدجاج، والثدييات ومثالها الفئران والأغنام للاستنساخ.

ولقد حرصت أيضا على أن يحتوي الكتاب على الصور الحقيقية للتجارب مع دعمها بالرسومات التوضيحية كلما أمكن، وقد أوجزت واكتفيت بالشرح الذي يفيد الدرس العملي، وقد جعلت في نهاية كل درس عملي ورقة يجيب عليها الطالب، ويقدمها للمعيد كتقرير عملي مما يساهم في رفع استفادته من الدرس العملي.

وأخيرا لا أدعي الكمال في عملي هذا، فالنقص والتقصير من طبع الإنسان، وأرحب بأي ملاحظات تفيد موضوع الكتاب.

المؤلف

المحتويات

العملي الأول

الأجهزة والأدوات المتوفرة بمعمل الأجنة التجريبي وعمل الأنابيب الدقيقة

Instruments and Equipment in The Lab of Experimental Embryology and Micropipette Preparation

الهدف

يهدف هذا العملي إلى التعرف على الأجهزة والأدوات المتوفرة وكذلك المهارات العملية في مختبر علم الأجنة ؛ وذلك لأن معظم الدراسات التجريبية على الأجنة تعتمد على الإمكانات والأدوات المتوفرة في المختبر، وعلى الاختيار الجيد للحيوانات كما أنها تحتاج إلى الصبر والمثابرة من الباحث، من أجل المتابعة أثناء إجراء التجارب.

سوف يتم التركيز في هذا الدرس العملي على معرفة الأجهزة والأدوات الخاصة بعمل التجارب علي الأجنة واستخدامها بشكل عام ، وسوف يترك تفصيل طريقة العمل وتشغيل الأجهزة والأدوات وتحضير المواد الواجب توفرها مع كل تجربة.

كما سوف يتم عمل الأنابيب الزجاجية (الماصة الصغيرة والأنشوطة الشعرية) ثم عمل الأنابيب الدقيقة Micropipettes للحقن المجهري Microinjections لمعاملة أجنة الثدييات تحت المجهر وذلك من خلال أجهزة عمل الأنابيب الدقيقة.

الأجهـــزة
Equipments

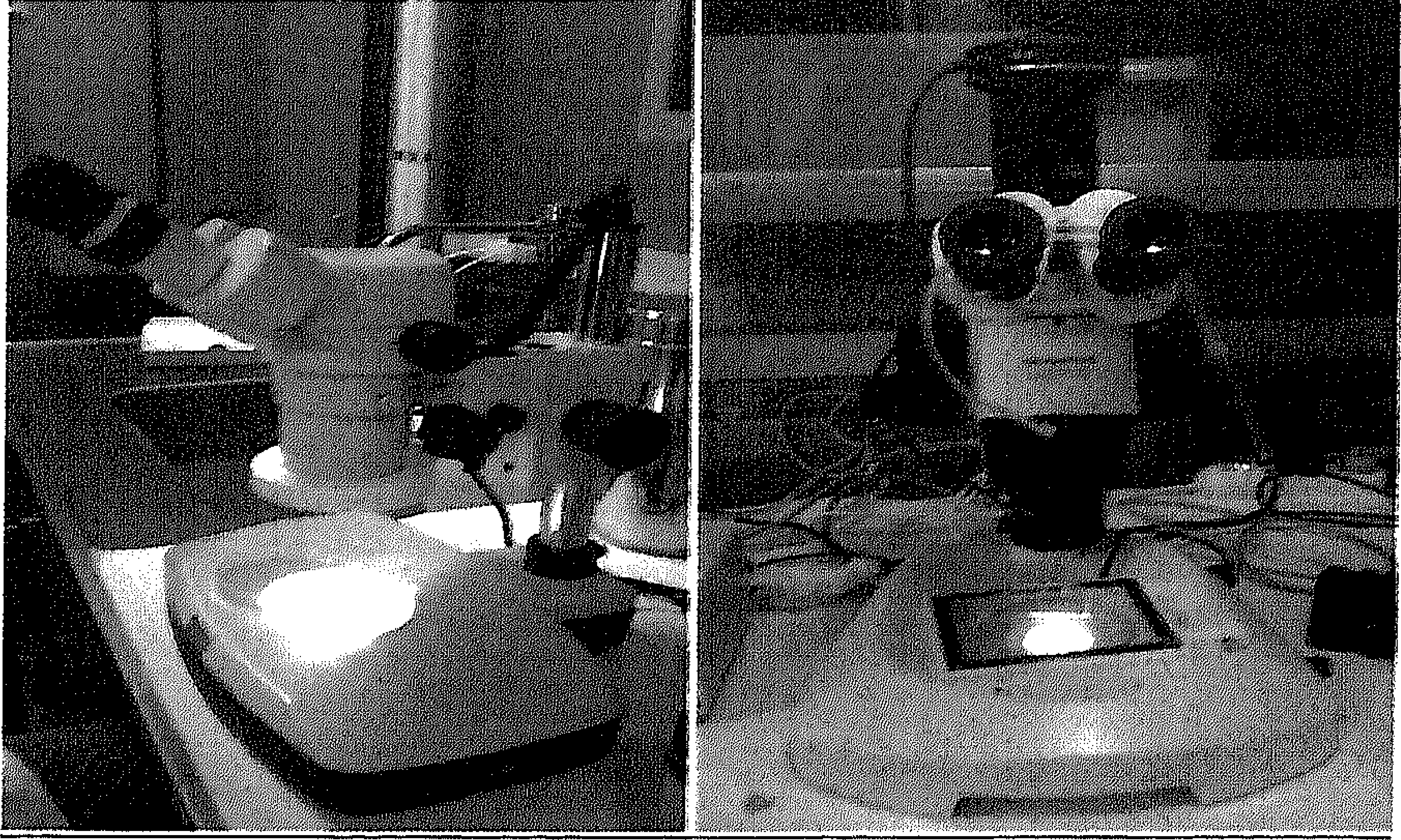
أولاً : المجاهر Microscopes

١– المجهر التشريحي Dissecting Microscope (الشكل رقم ١,١)

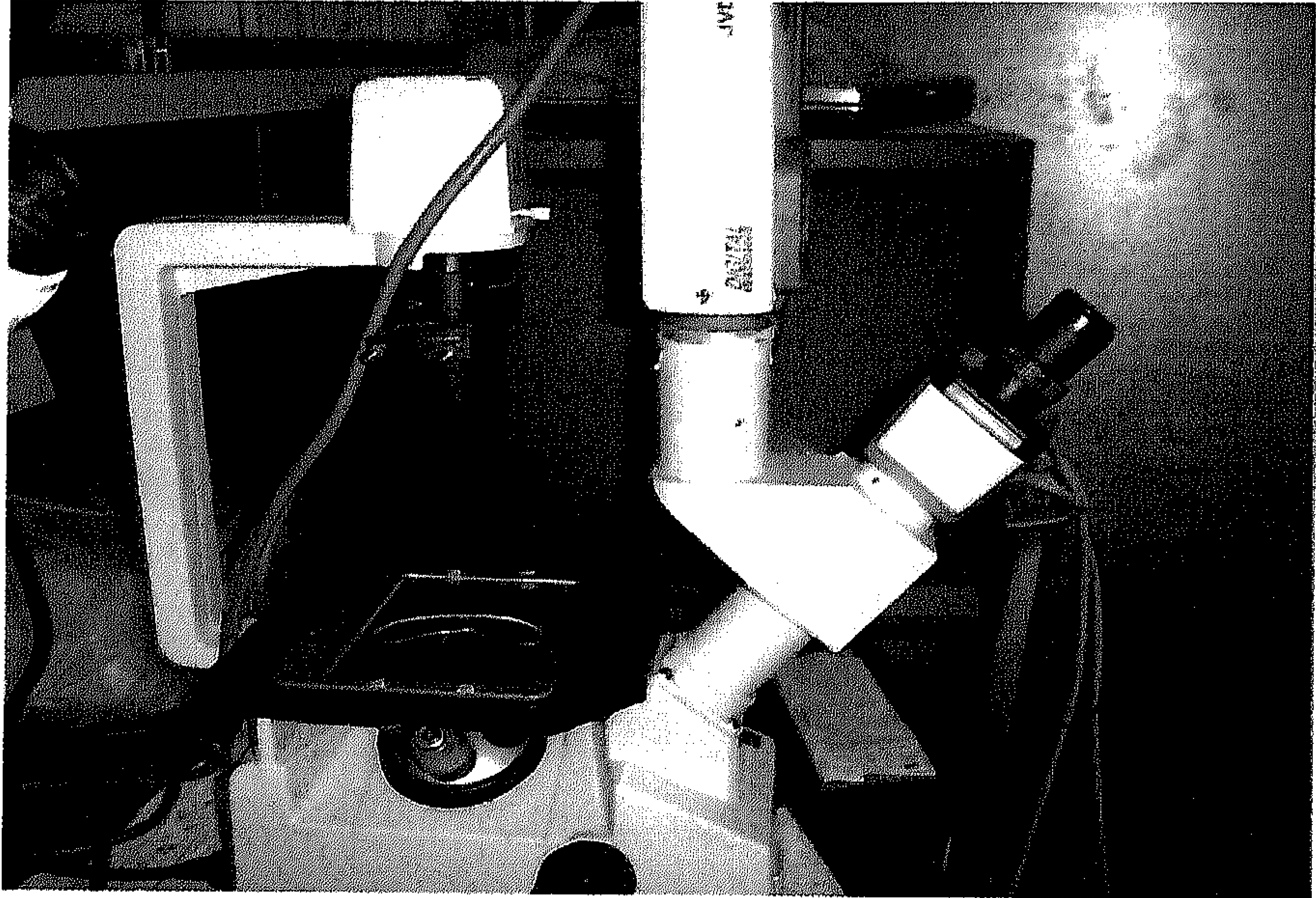
إن توفر مجهر تشريحي ذي قوة تكبير تتراوح ما بين ٥ – ٢٥ مرة تعتبر قوة مناسبة لمعظم الأجنة التي يمكن رؤيتها بالعين المجردة، كالطيور والضفادع، أما أجنة الثدييات فتحتاج إلى قوة تكبير تتراوح ما بين ١٠ – ١٠٠ مرة. يفضل أن يزود المجهر التشريحي بمنظم للحرارة ويوضع على مسرح الفحص للمجهر تتناسب درجة حرارته مع الخلايا المفحوصة فمنظم درجة الحرارة الذي يتراوح مداه بين ١٨ – ٤٠° م يعتبر مناسبا لمعظم الأجنة، كما يفضل أن يكون المجهر التشريحي مزوداً بإضاءة سفلية غير مباشرة وأخرى علوية، كما يفضل أن يكون المجهر التشريحي من النوع الذي يمكن تزويده بكاميرا للتصوير عند اللزوم.

٢– مجهر مقلوب العدسة Inverted Microscope (الشكل رقم ١,٢)

المجهر مقلوب العدسة هونفس المجهر العادي لكن يختلف عنه بأن العدسة الشيئية تكون من أسفل، كما تختلف فتحة المسرح فيه عن المجهر العادي؛ لأنه معد لفحص العينات كالخلايا والأجنة وهي حية أوفي الوسط السائل في أطباق بتري، ويفضل أن يكون مسرح الفحص للمجهر مزوداً بسخان لتدفئة الأجنة أوالبويضات والحيوانات المنوية أثناء الفحص، لذا يعتبر المجهر مقلوب العدسة من المجاهر الضرورية لمعمل أجنة الثدييات؛ لأنه يسمح بفحص الخلايا الجنينية المبكرة وهـي في الطبق للمتابعة، كمـا يفضل أن يزود بكاميرا أوشاشة عرض متصل بحاسب آلي للتصوير وللعرض والتسجيل وسهولة الفحص أحيانا.



الشكل رقم (١,١). مجهر تشريحي Dissecting Microscope.

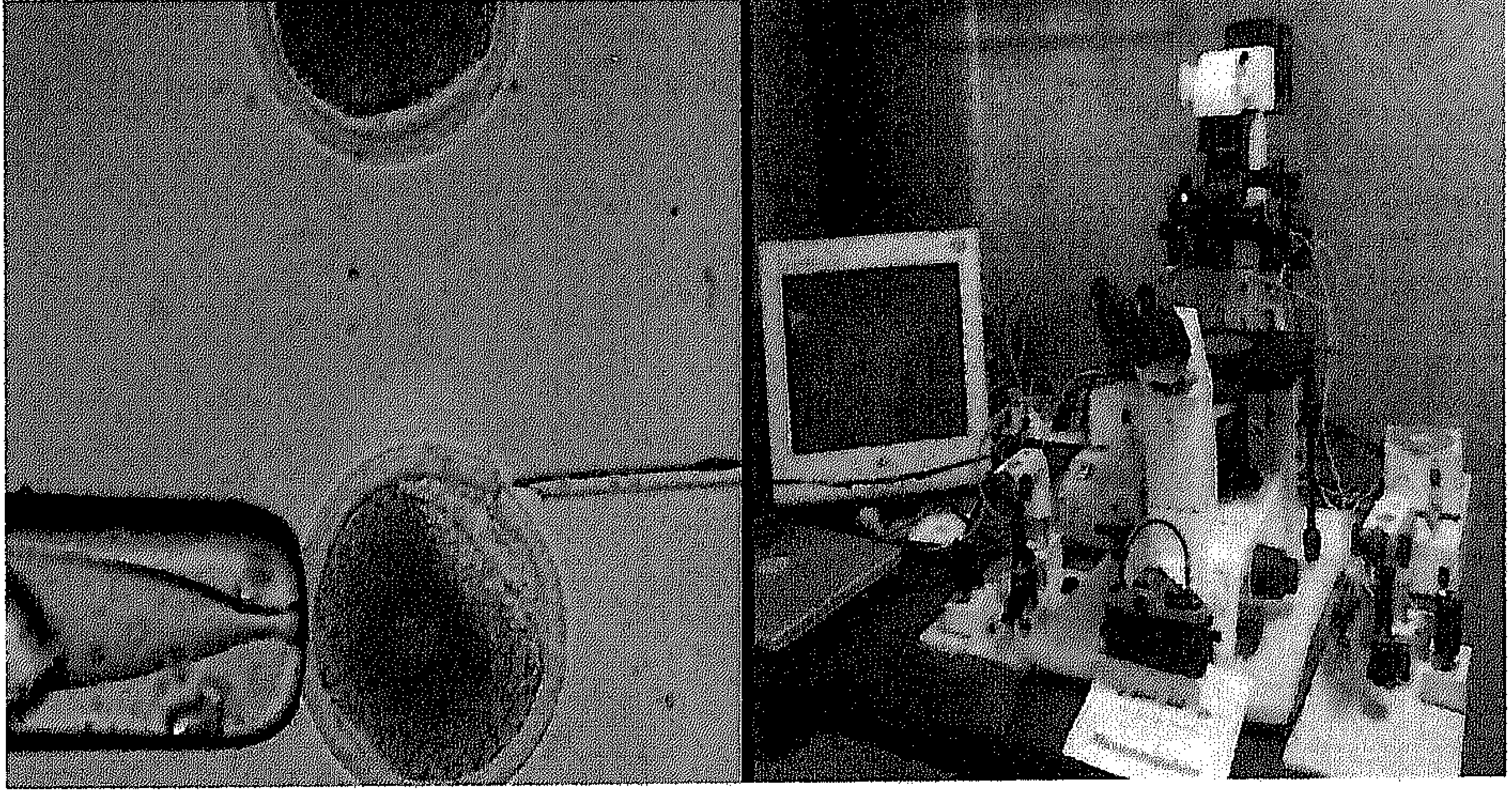


الشكل رقم (١,٢). مجهر مقلوب العدسة بشاشة عرض Inverted Microscope with monitor.

٣- مجهر المعالجات الدقيقة أوالحقن المجهري Micromanipulator (الشكل رقم ١،٣)

جهاز المعالجات الدقيقة (Micromanipulator) أوجهاز الحقن المجهري هونفس المجهر مقلوب العدسة لكنه مطور بحيث تركب عليه أجهزة المعالجات الدقيقة من جهاز الحقن الدقيق (Microinjector) وجهاز المسك أوالحامل الدقيق (Micropipette Holder) وكلاهما يتحرك بآلية دقيقة جدا تصل إلى أقل من الميكرون بشكل ثلاثي الأبعاد ، وتركب أوتثبت عليها الأنابيب الزجاجية الدقيقة لمعالجة الخلايا مثل حقن الحيوان المنوي داخل البويضة أوسحب أوحقن الجينات أوبعض الخلايا داخل الجنين. غالبا يتصل الجهاز بحاسب آلي أوشاشة عرض وسوف يتم شرح طريقة عمل الجهاز في عملي الحقن المنوي للبويضات. ولاغنى لوحدات طفل الأنابيب عن جهاز المعالجات الدقيقة، ولعمل الاستنساخ يزود مجهر المعالجات الدقيقة بوحدة الدمج الخلوي الكهربائي والتي سوف نتعرف عليها في الجزء العلمي الخاص بها.

(أ) (ب)

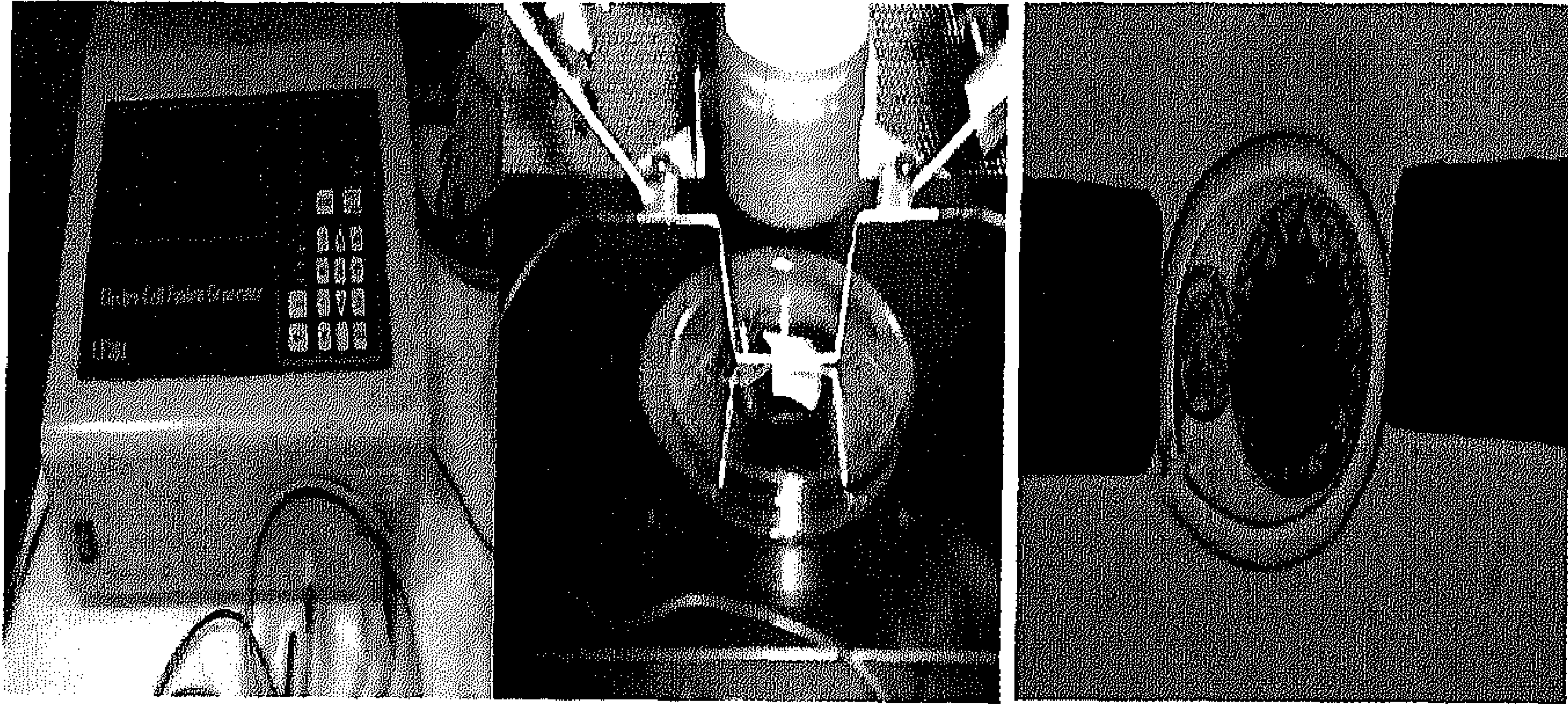


الشكل رقم (١،٣). مجهرالمعالجات الدقيقة أوالحقن المجهري (Micromanipulator) صورة مجهر الحقن المجهري (أ) وأخرى (ب) توضح كيف تبدوالصورة تحت جهاز الحقن المجهري الدقيق وطريقة الإمساك بالبويضة بواسطة الأنبوبة ثم حقنها بأنبوبة الحقن الدقيقة.

جهاز الدمج الخلوي الكهربائي Electro Cell fusion (الشكل رقم ١,٤)

هوعبارة عن جهاز يعمل على دمج الخلايا دون قطع الغشاء الخلوي عن طريق توصيل تيار كهربائي بالميكروفولت بين قطبي الجهاز (سالب وموجب) والذي يكون بينهما الخليتان المراد دمجهما معا لمدة أجزاء من الثانية.

أ) البويضة والخلية بين القطبين. ب) جهاز الحقن المجهري. ج) جهاز الدمج الخلوي.



الشكل رقم (١,٤). البويضة كما تبدو بين قطبي جهاز الدمج الخلوي الكهربائي المركب على جهاز الحقن المجهري (Electro Cell fusion and Manipulator).

ثانياً : الحضانات Incubators

تعتبر الحضانات من الأجهزة الأساسية والضرورية لمعمل الأجنة، وتختلف الحضانات الخاصة ببيض الضفادع والأسماك عن تلك اللازمة لأجنة الطيور والزواحف، التي بدورها تختلف عن تلك الخاصة بأجنة الثدييات، وتتفق الحضانات بشكل عام في الشروط الواجب توفرها في الحضان وهي : منظم لدرجة الحرارة، ومصدر للرطوبة النسبية، ومصدر للتهوية.

١- حضانات بويضات البرمائيات والأسماك (الشكل رقم ١,٥)

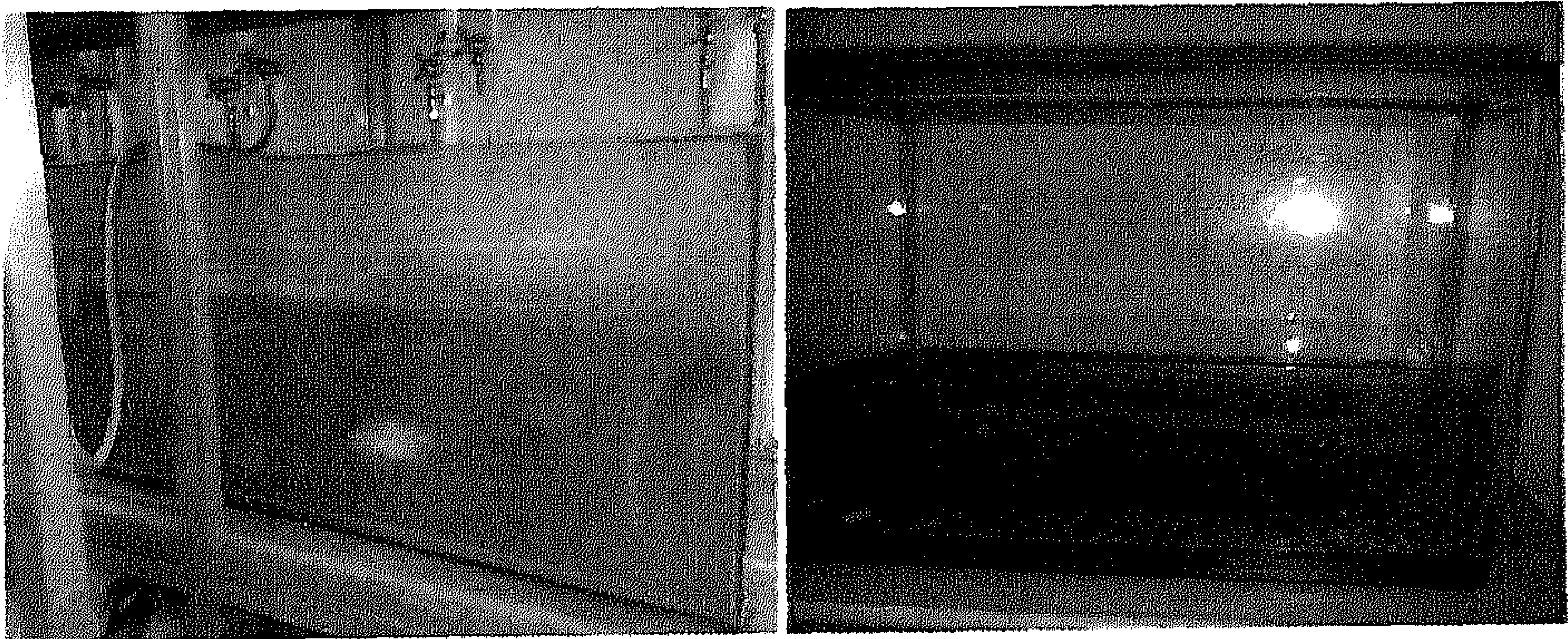
هي نفس الأحواض المائية التي تربى فيها الأسماك والبرمائيات وتزود بتهوية ودرجة حرارة مناسبة تتراوح بين ١٨ - ٢٥°م مع فلتر لتنقية الماء، ويحضن بيضها في أحواض منفصلة كي لا يؤكل وحتى تكون المياه شبه راكدة.

٢- حضانات بيض الزواحف والطيور (الشكل رقم ١,٦)

حضان بيض الطيور والزواحف عبارة عن صندوق به عدة أرفف متصلة بمقلب أومحرك لوضع ولتقليب البيض ببطء حتى لا تلتصق الأجنة بقشرة البيضة عند نموها خاصة بالنسبة لبيض الطيور. كما أنه يكون مزود بمنظم للحرارة (٢٠- ٣٩° م) وتركب به مروحة للتهوية، ويحتوي على حوض يوضع به ماء مقطر من أجل توفير الرطوبة النسبية للبيض.

٣- حضان بويضات الثدييات (الشكل رقم ١,٧)

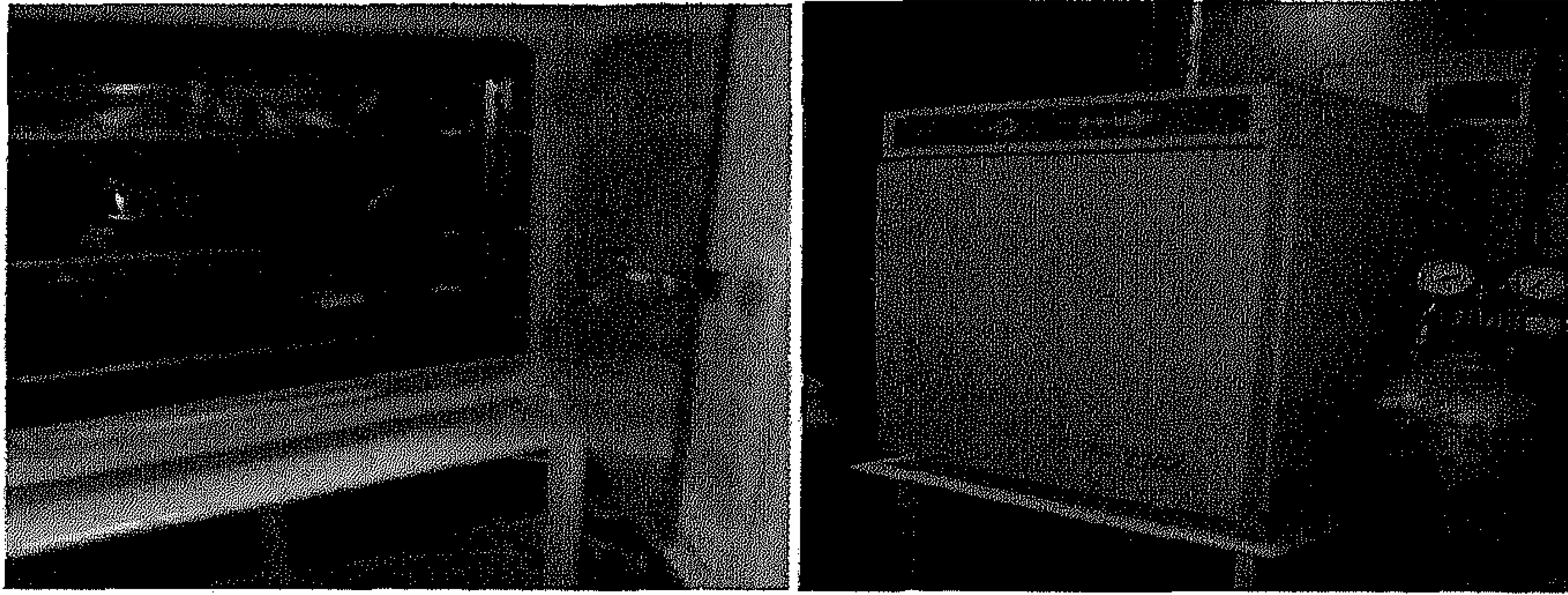
حضان بويضات الثدييات يكون أكثر تعقيدا في التركيب حيث يزود بمنظم لدرجة الحرارة يتراوح مداه بين ٣٧ و٤٠° م يتصل بأسطوانة هواء خاصة تحتوي على ٥٪ ثاني أكسيد الكربون، ٩٥٪ هواء (Air 95% +5% CO2)، مع رأس منظم للأسطوانة لتنظيم دخول الهواء للحضان، كما يحتوي على مروحة للتهوية الجيدة للحضان، أما بالنسبة لمنظم الرطوبة النسبية فإنه قد يزود بحاوية لوضع الماء المقطر فيها وتوضع غالبا داخل الحضان بالأسفل.



الشكل رقم (١,٥). حضان أوأحواض بويضات البرمائيات والأسماك.



الشكل رقم (١,٦). حضان بيض الطيور مزود بمنظم حرارة ورفوف ومحرك للرفوف ووعاء للماء في الأعلى، وفقاسة يوضع بها البيض قبل الفقس بيومين.

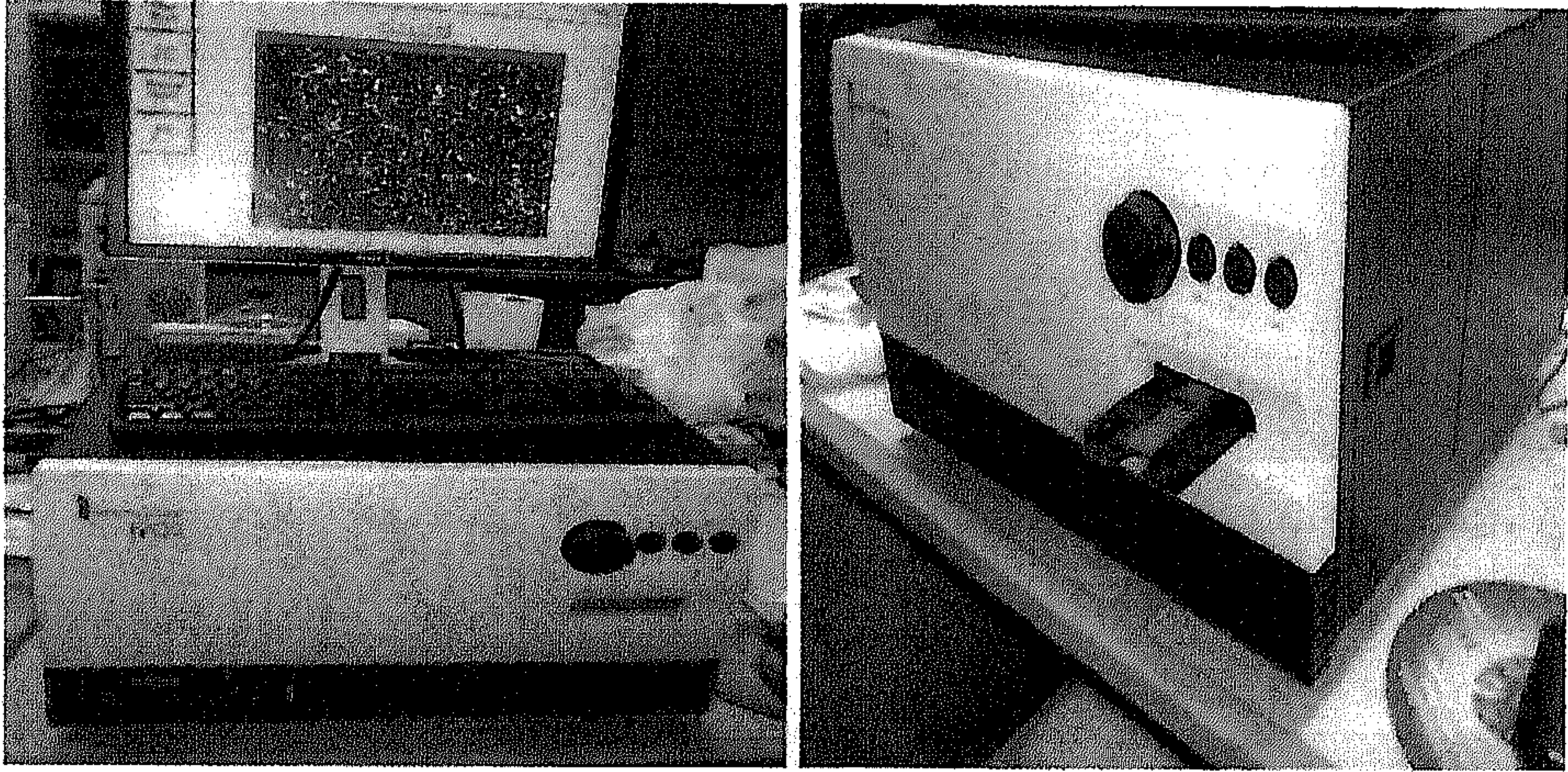


الشكل رقم (١,٧). حضان بويضات الثدييات مزود بأسطوانة غاز ثاني أكسيد الكربون (5%CO2).

ثالثاً : جهاز تحليل السائل المنوي Semen Analyzer (الشكل رقم ١,٨)

هوعبارة عن مجهر مزود بشاشة بدل العدسة العينية مرتبط بحاسب آلي يحتوي على برنامج خاص لتحليل تركيز وحركية الحيوانات المنوية، كما يقيس الجهاز عدد الحيوانات المنوية الحية والميتة في العينة عن طريق صبغات خاصة، بحيث توضع قطرات من السائل المنوي على شرائح زجاجية مقسمة خاصة بالجهاز ثم تدخل أسفل العدسة الشيئية ويتم

تشغيل البرنامج وضبطه لتحليل الحيوانات المنوية بقراءة حركية وعدد الحيوانات المنوية على عدة مناطق من الشريحة وسوف يتم توضيح كيفية عمل الجهاز وتفصيلة في الجزء العملي لتحليل السائل المنوي فيما بعد.



الشكل رقم (١,٨). جهاز تحليل السائل المنوي Semen Analyzer.

رابعاً: المعقمات Sterilizers (الشكل رقم ١,٩)

نظرا لأهمية التعقيم عند تحضير بيئات زراعة الخلايا وتنمية الأجنة والتي تعتبر من الخطوات الضرورية لمنع تلوث الخلايا والأجنة بالكائنات الحية الدقيقة وغيرها عند تنميتها، فلابد من مراعاة عمليات التعقيم في جميع خطوات العمل وتشمل المعقمات مجموعة من الأجهزة والمعدات.

أ) **المعقمات الحرارية Heater Autoclaves**: الهدف منها تعقيم الأدوات والمواد الخاصة بزراعة الخلايا والأجنة، وذلك باستخدام الحرارة العالية نوعا ما، لقتل ما قد يكون عالقا بها من فيروسات أوبكتريا وتنقسم إلى :

١- الأفران Oven: (الشكل رقم ١,٩أ): تعمل الأفران على قتل الميكروبات بدرجات حرارة عالية والتي تتراوح ما ين ٥٠-٣٠٠° م. وتستخدم الأفران لتجفيف وتعقيم الأدوات المستخدمة والزجاجيات.

٢- الحمام المائي الساخن Hot water Bath: يستخدم الحمام لتعقيم الأدوات وذلك بوضعها في الحمام المائي الذي تصل فيه درجة الحرارة إلى درجة غليان الماء.

٣- جهاز تعقيم البيئات Autoclave: (الشكل رقم ١,٩ب): هوعبارة عن وعاء معدني محكم الغلق يستخدم لتعقيم المواد السائلة (كالبيئات) وكذلك الأدوات والزجاجيات تحت البخار، وذلك برفع الضغط وتقليل درجة الحرارة المستعملة داخليا لقتل الميكروبات، ويكون مزودا بساعة توقيت وتوصيلة للماء الداخل والخارج.

أ) فرن التسخين الحراري (Oven). ب) جهاز التعقيم Autoclave.



الشكل رقم (١,٩). يوضح صور فرن التسخين (أ) وجهاز التعقيم (ب) Heater Autoclaves.

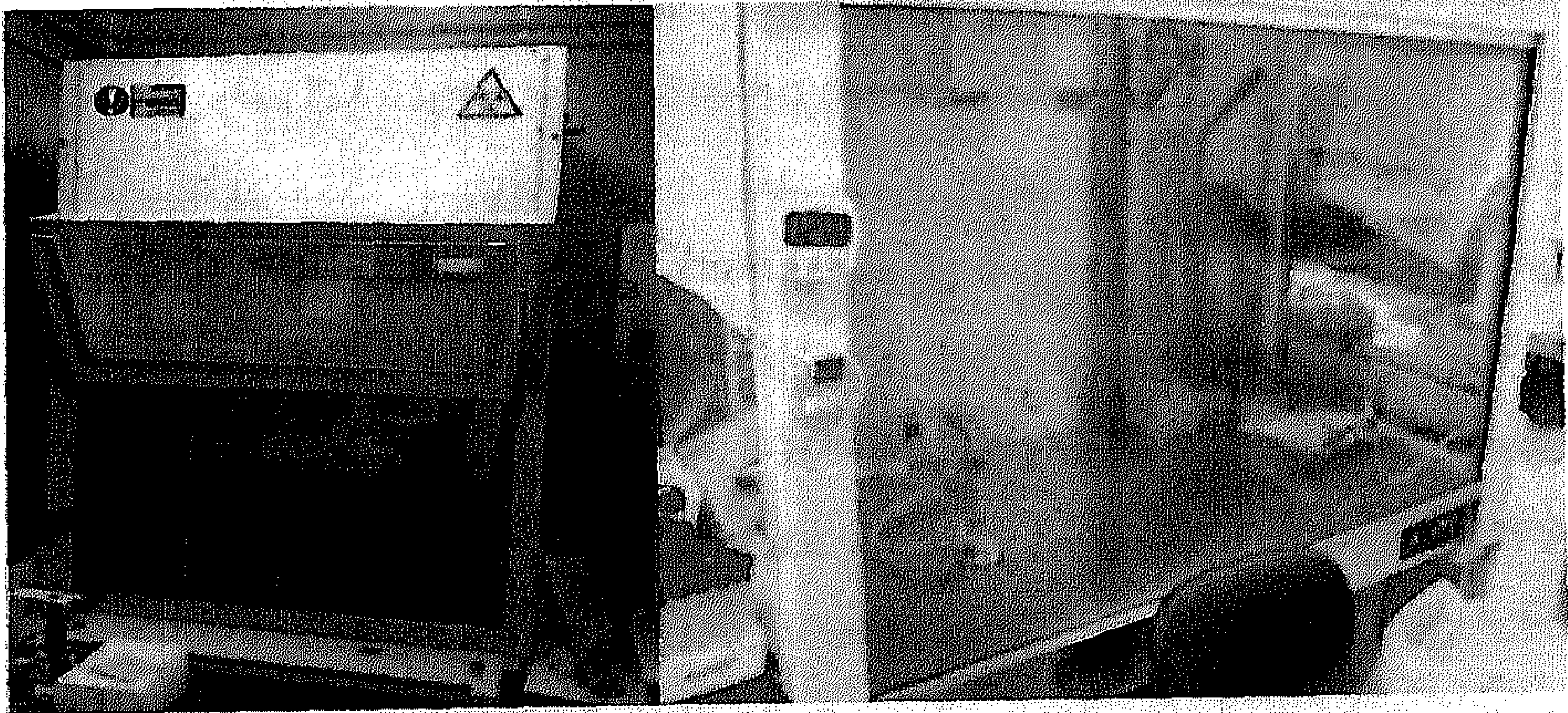
ب) المرشحات أو(الفلاتر) Filters (الشكل رقم ١,١٠): تصنع المرشحات من البلاستيك على شكل حيزين بينهما أوراق ترشيح معقمة ذات مسام دقيقة يتراوح قطرها ما بين ٢ و٢٠٠ ميكروميتر ولا تنفذ منها الشوائب فتستخدم لتنقية الغازات الواصلة إلى الحضانات (كالهواء) أولتعقيم المحاليل لمنع مرور الميكروبات (كالبيئة الخاصة بزراعة الأجنة). وهي إما أن تكون على شكل كأسين صغيرتين بينهما ورقة ترشيح ، وإما على شكل قرص يثبت على إبرة يمر من خلاله المحلول المراد تعقيمه.



الشكل رقم (١,١٠). أنواع من المرشحات أوالفلاتر Filters.

ج) دولاب أوكابينة التعقيم Laminar Flow Hood (الشكل رقم ١,١١):

هوعبارة عن دولاب غالبا يكون مصنوعاً من الألمنيوم ومزوداً بإضاءة عادية وأخرى للأشعة فوق البنفسجية (UV-Light) لتعقيم الأسطح ومحبس للغاز وآخر لشفط السوائل، كما يحتوي على مروحة مغلفة بمرشح (فلتر) (لطرد الهواء للخارج) تجري فيه تحضير البيئات الخاصة بالأجنة وتغيير بيئات زراعة الخلايا لمنع تلوث العينات.



الشكل رقم (١,١١). كابينة التعقيم أوالهود Laminar Flow Hood.

خامساً: الأدوات Instruments (الشكل رقم ١,١٢)

وتشمل مجموعة من الأدوات التي تستخدم في معمل زراعة الخلايا والأجنة.

١- سخـان المجهـر وسخـان الشرائح Slieds warmer or hot plate (الشكل١,١٢أ): هوعبارة عن صفيحة معدنية تسخن كهربائيا لتعطي درجة حرارة مناسبة تتراوح ما بين ٢٠ و٤٠°م غالبا يستخدم لتجفيف الشرائح كما يستخدم للمحافظة على حيوية الحيوانات المنوية وخلايا الأجنة أثناء إجراء التجربة أوالتعامل معها، وكذلك للحفاظ على درجة حرارة البيئة أوالأدوات أثناء عمل التجربة.

٢- جهاز التقطيع Microtome: يستخدم جهاز التقطيع أوالميكروتوم لعمل قطاعات الشرائح الشمعية للعينات بعد انتهاء التجارب والتي تطمر في كتل من شمع البرافين قبل تقطيعها بهذا الجهاز، ومستلزماته متوفرة في وحدة تحضير الشرائح.

٣- جهاز لقياس الأس الهيدروجيني pH Meter: نظرا لأهمية تركيز الأس الهيدروجيني، خاصة بالنسبة لعملية التبادل الأيوني على جانبي غشاء الخلية، فإنه يجب قياس الأس الهيدروجيني لبيئة زراعة الخلايا أوتنمية الأجنة فيها. ويتراوح مدى الأس الهيدروجيني لمعظم بيئات زراعة الخلايا والأجنة بين (pH=7.0,7.8).

٤- جهاز طرد مركزي Centrifuge: ويستخدم لفصل الخلايا أومحتوياتها أو السوائل في المحاليل على درجات مختلفة من سرعة الدورات حسب الزمن المرغوب مثلا ٥٠٠٠ دورة بالدقيقة لمدة ٥ دقائق.

٥- الموازين Balances (الشكل رقم١,١٢ب): يجب توفر ميزان دقيق يزن المقادير الصغيرة التي قد تصل إلى ميكروجرام واحد من المكونات الخاصة بالبيئات أوالهرمونات. كذلك ميزان لوزن المقادير الأكبر نوعا ما، حيث يتراوح مداه بين ١- ١٠٠٠جرام.

٦- أجهـزة الحفـظ بالتجميـد Freezing Preservation Equipment (الشكـل رقـم ١,١٢هـ.و): وهي إما أن تكون الثلاجات العادية وفريزارات عميقة التجميد والتي تصل درجة حرارتها إلى (-٢٠ أو-٤٠ أو-٨٠°م) والتي تستخدم لحفظ بعض مكونات البيئة في عينات الأجنة ، كما يمكن حفظ الخلايا والحيوانات المنوية والأجنة في سائل غاز النيتروجين (-١٩٨°م) ، وهناك أجهزة خاصة لعملية تجهيز وحفظ الخلايا والأمشاج والأجنة في سائل النيتروجين، سوف يتم شرح عمل ذلك في الجزءالعملي الخاص بالحفظ بالتجميد.

أطباق بتري وأدوات التشريح:

أ) **أطباق بتري**: وهي تستخدم لزراعة الخلايا والأجنة وتوجد عدة أنواع وأشكال لأطباق بتري منها ماهو مقسم إلى عدة حيزات (٢-٤-٦-١٢) تقسم أسطحها الداخلية لعد وفحص خلايا الأجنة ؛ وأطباق بتري غالبا تكون مغلفة ومعقمة وبعضها يكون مزوداً بطبقة جلاتينية لزراعة الخلايا عليها، كما أن هناك دوارق ذات فتحة جانبية ذات سعات متعددة (٢٥-٥٠- ٧٥مل) تستخدم لزراعة الخلايا الجذعية أوالليفية.

ب) **أدوات التشريح والعمليات الجراحية وتشمل** (الشكل رقم ١,١٢ج.د)

الملاقط: التي يجب أن تكون ذات أحجام صغيرة نوعا ما ومدببة.

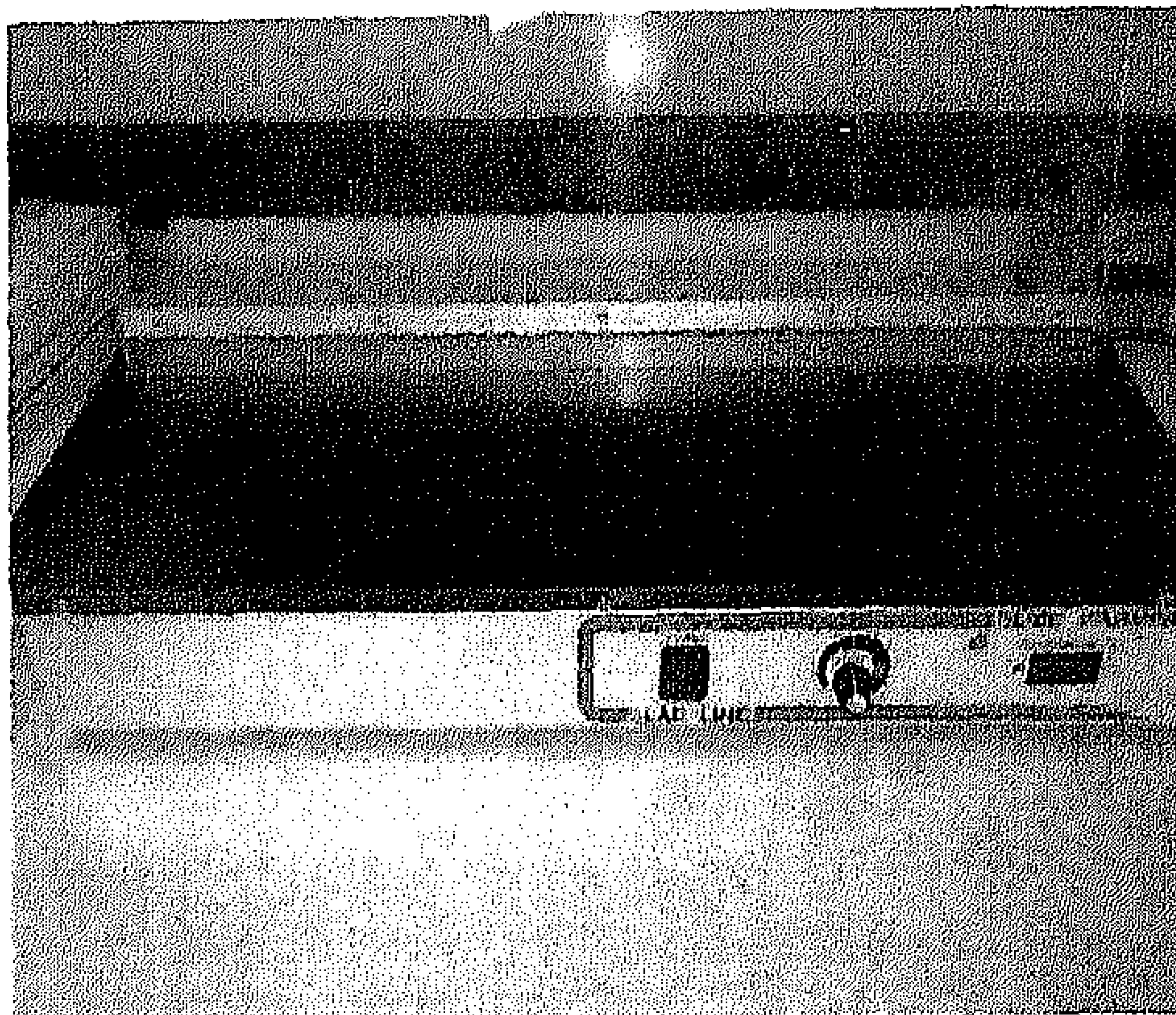
المقصات: التي يجب أن تكون ذات أحجام مختلفة.

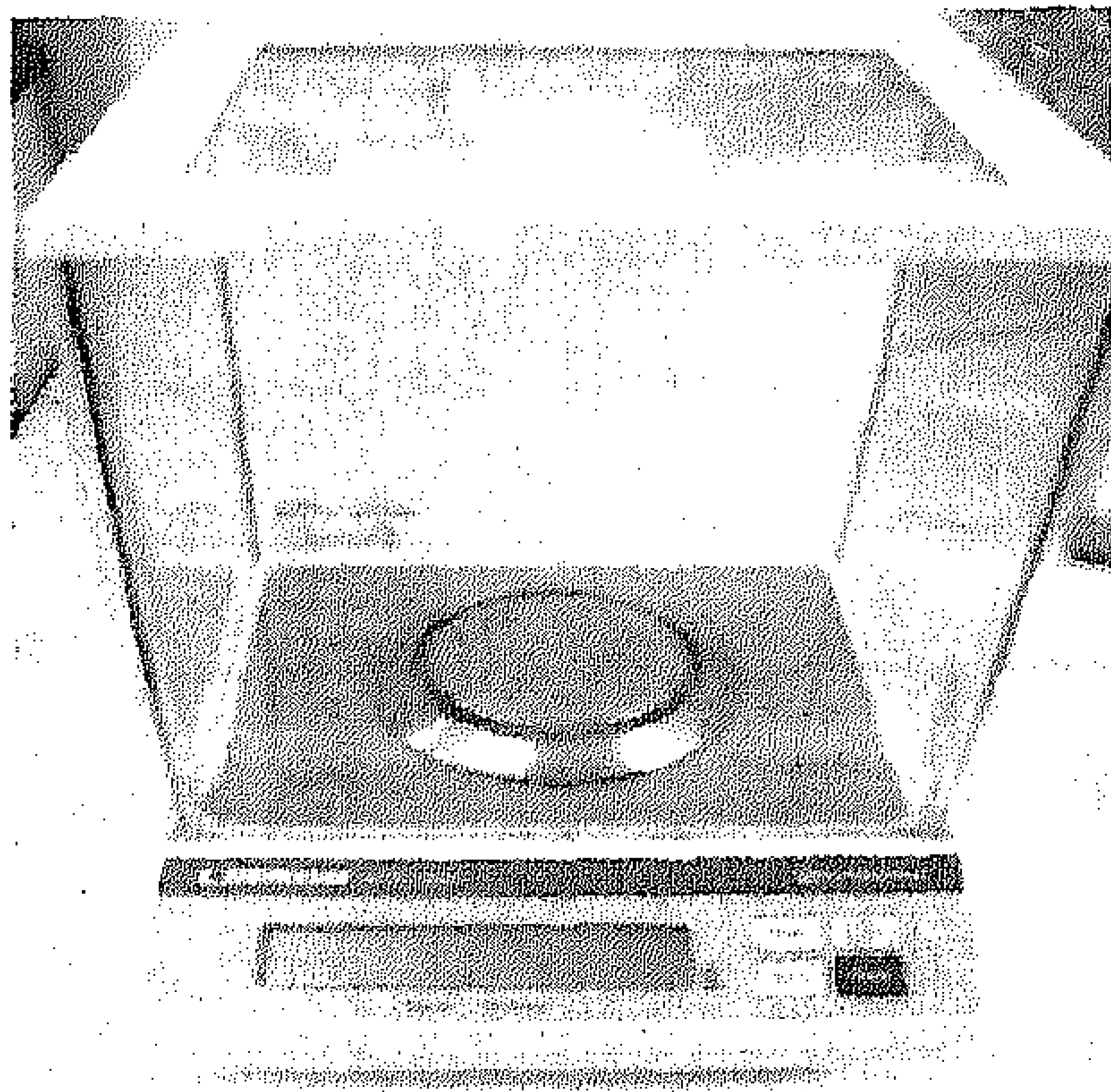
المشارط: يجب أن تكون حادة وذات أحجام مختلفة.

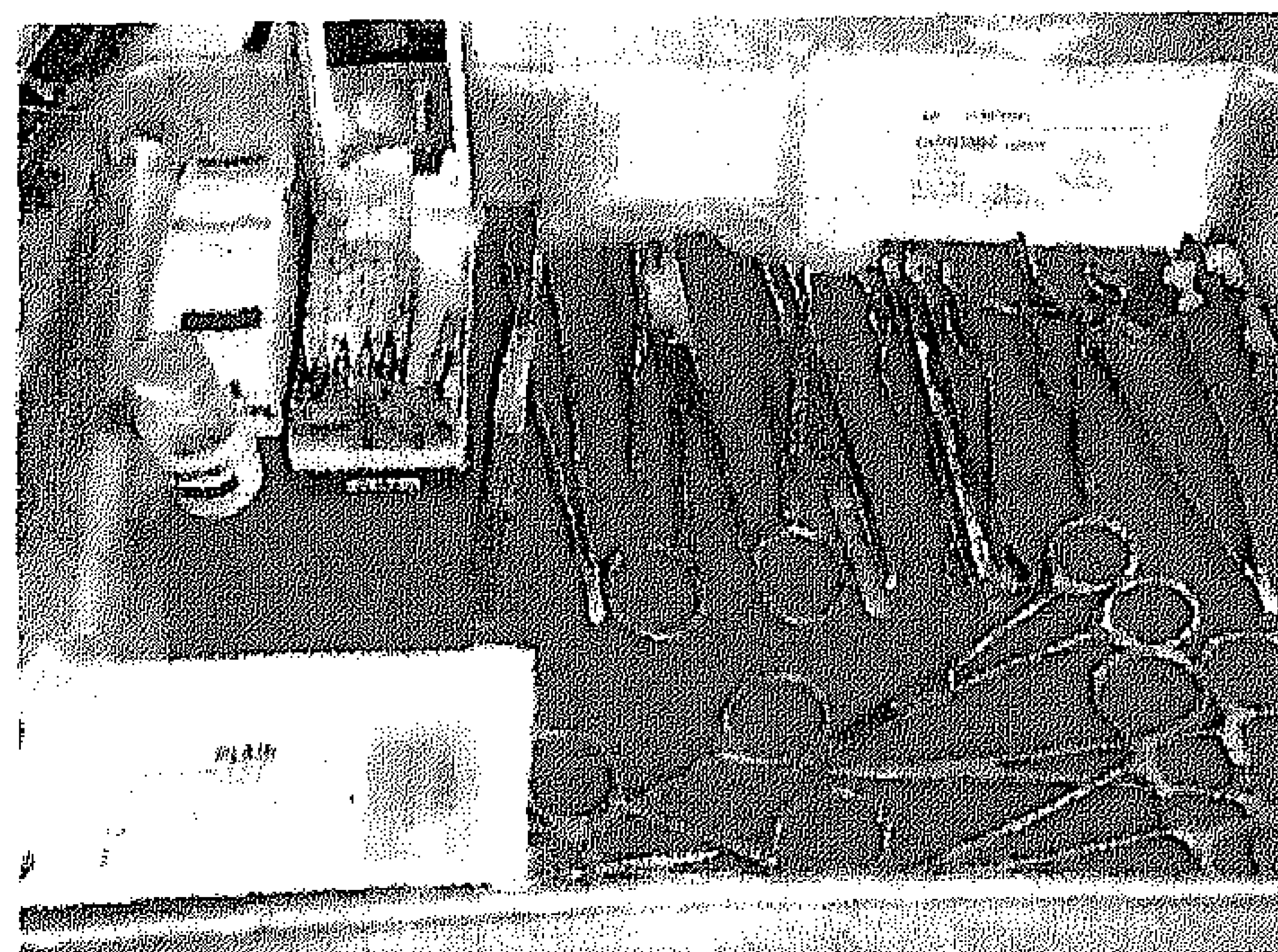
أدوات العمليات الجراحية من إبر خياطة هلالية الشكل ذات أحجام مختلفة ومتصلة بخيوط الجراحة الداخلية (والتي تصنع من أمعاء الحيوانات لكي تذوب بعد العملية الجراحية) والخيوط الخارجية التي تصنع من الحرير. كما يمكن إغلاق الجرح خارجيا بعد العملية الجراحية بواسطة دبابيس الخياطة الخارجية ولها دباسة خاصة ونتاشة لإزالتها بعد التئام الجرح.

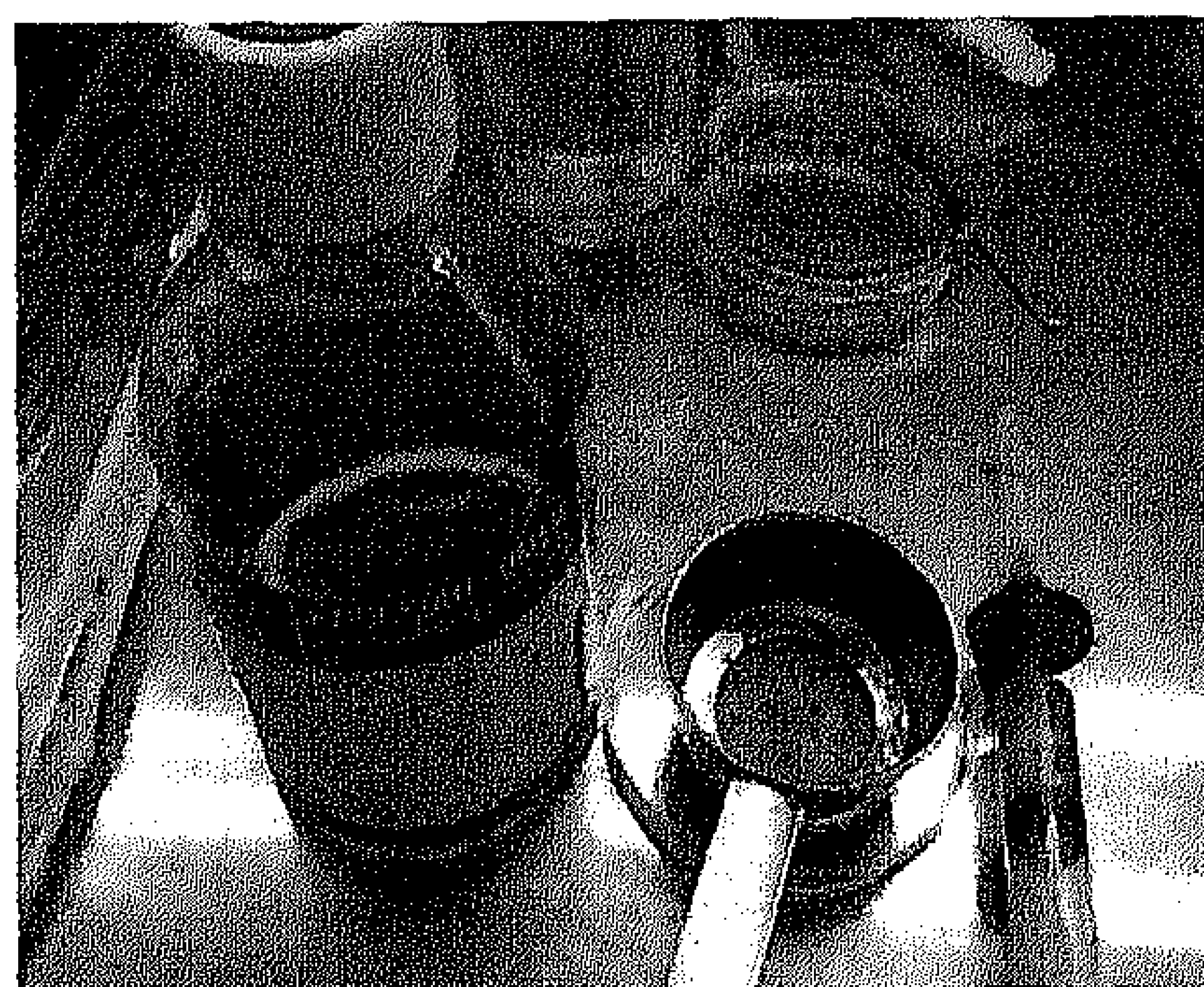
ويفضل أن تكون جميع أدوات التشريح من النوع الذي لايصدأ، حتى يمكن غسلها وتعقيمها واستعمالها عدة مرات.

أ) سخان الشرائح. ب) ميزان حساس.

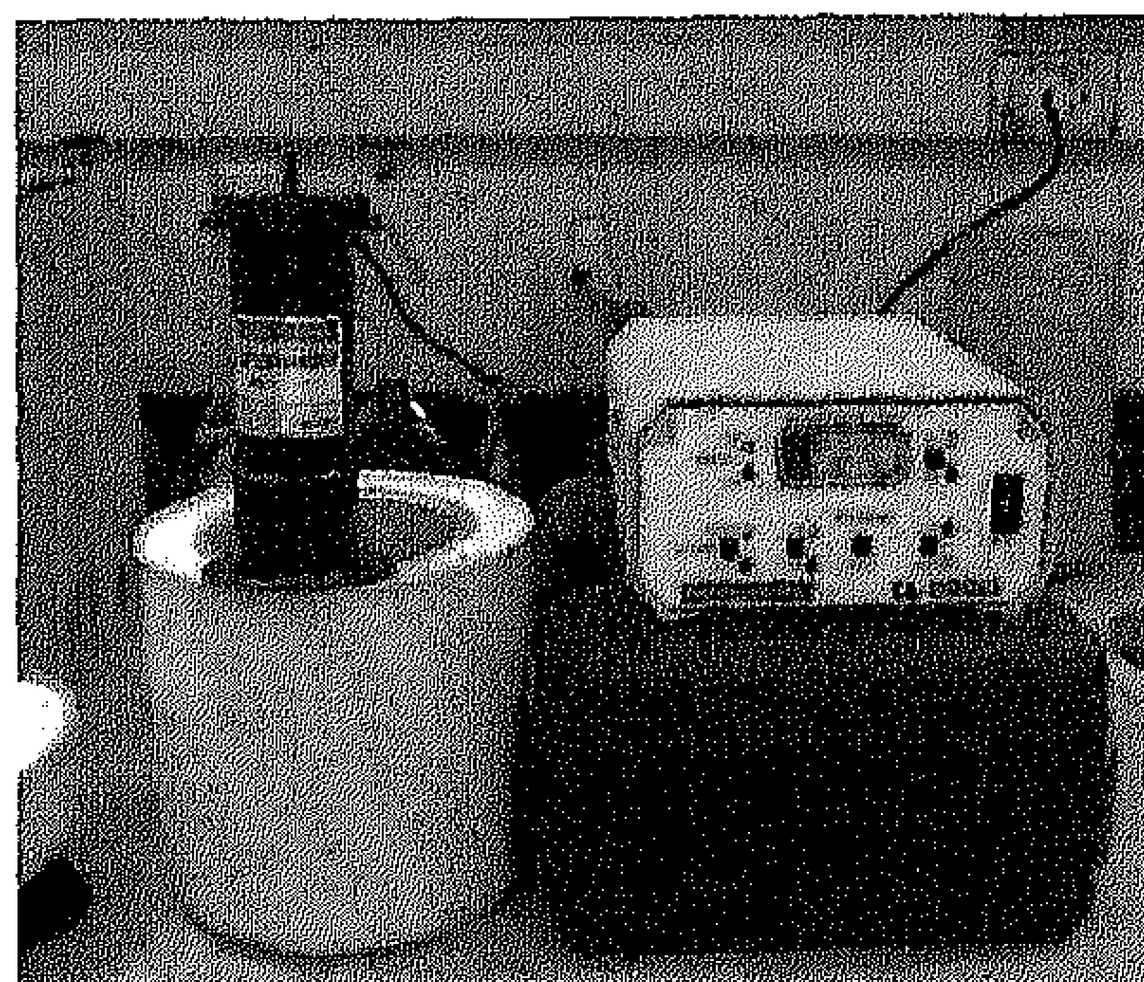


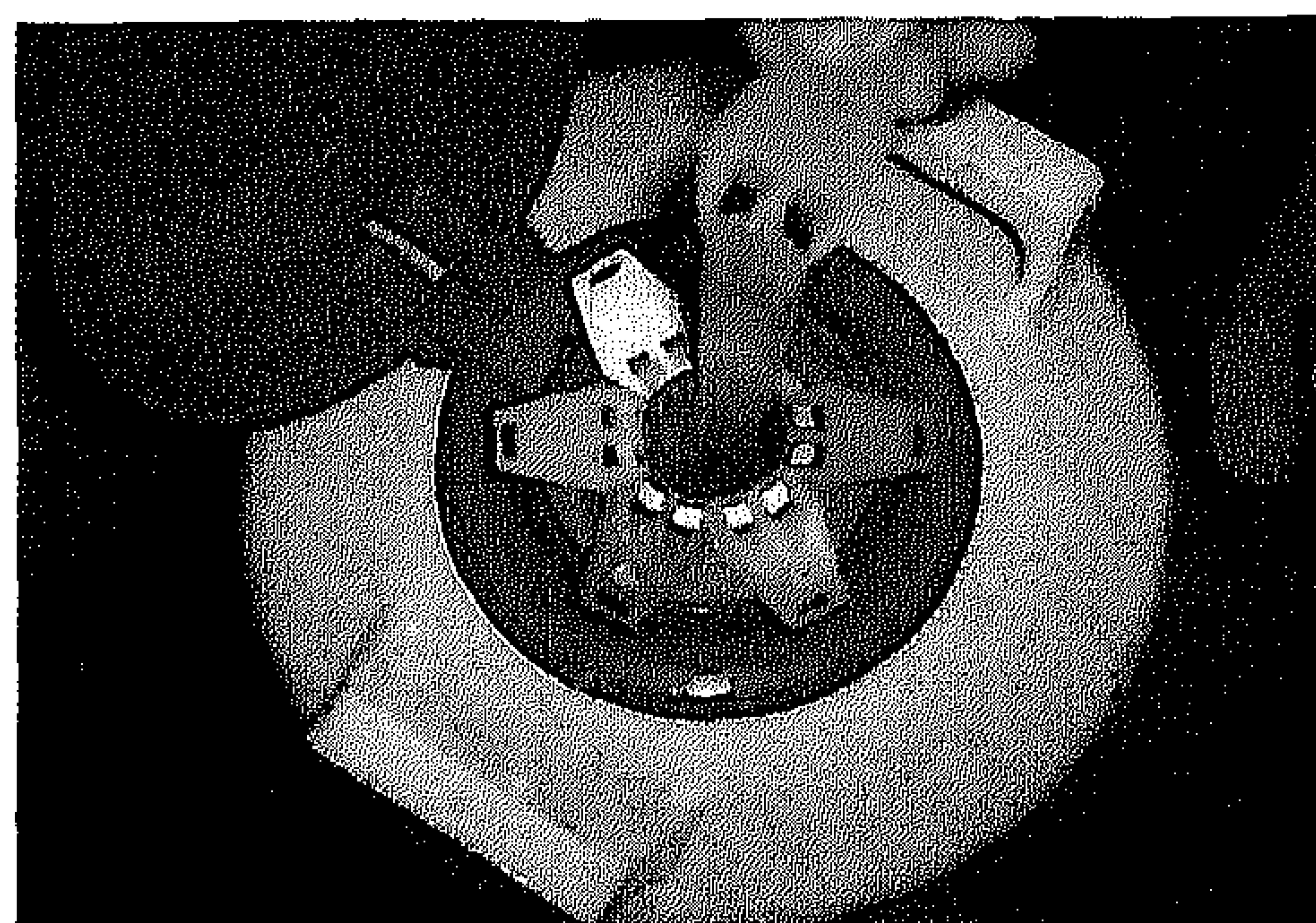






هـ) جهاز تجميد الخلايا والأجنة. و) حاوية حفظ الخلايا والأجنة المجمدة في سائل النيتروجين.





الشكل رقم (١,١٢). مجموعة صور لبعض الأدوات الخاصة بمعمل زراعة الخلايا والأجنة.

طريقة عمل وصنع الماصات وإبر وأنابيب التشريح الدقيقة

أ) عمل ماصات السحب الزجاجية Glass pipette (الشكل رقم ١,١٣)

تستعمل الماصات الزجاجية لإجراء المعالجات الدقيقة للأجنة ومن الضروري توفر ماصات ذات أحجام مختلفة تتراوح أقطارها ما بين ٠,١ – ٠,٥ ملم.

ويمكن عمل ماصات سحب الأجنة بتسخين أنبوبة زجاجية (قطرها ٥ ملم وطولها ١٠ سم) عند منتصفها علي لهب مصباح بنزن، ثم سحبه من الجهتين للحصول على ماصتين لهما فتحة دقيقة ومناسبة يتراوح قطرها الأمامي المدبب بين ٠,١ – ٠,٢ ملم وطولها حوالي ٥ سم، ويمكن ثني أحد الطرفين بعد ذلك لعمل زاوية حسب الرغبة في استعمال هذه الماصات. ويستحسن تسخين حافتي الماصة باللهب بعد عملية السحب حتى لا تكون حادة الطرف، كما أن هناك ماصات خاصة لسحب كميات قليلة من السوائل تقدر بالميكروميتر، مثل ماصة هاميلتون.

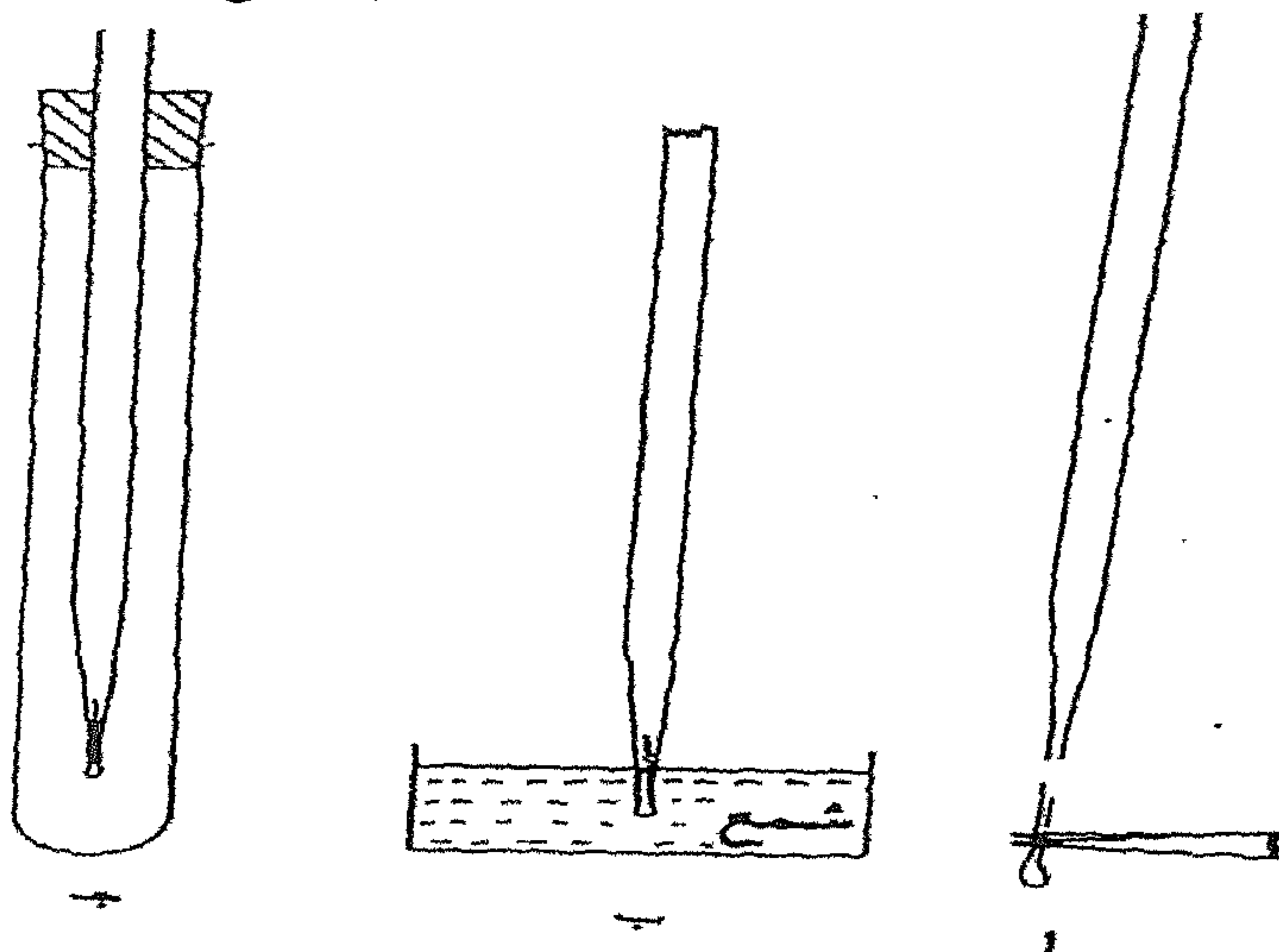
ب) طريقة صنع الأنشوطة الشعرية Hair Loop (الشكل رقم١,١٣)[(١)]

هي عبارة عن أداة تستخدم في مسك الأجنة في الطبق، ويمكن عملها بإدخال طرف شعرة قصيرة لينة قطرها ١ ملم (من الجفن مثلا) في فتحة أنبوبة أوقطارة زجاجية، يمكن تثبيت الشعرة في حاملها الزجاجي عن طريق غمس طرف القطارة في شمع البرافين المصهور (درجة انصهاره ٦٠ مْ) بحيث يدخل الشمع المصهور داخل طرف القطارة بالخاصية الشعرية ثم يرفع من الشمع وتوضع الشعرة في طرف الفتحة الزجاجية للقطارة بالخاصية الشعرية ثم ترفع من الشمع وتوضع الشعرة في طرف الفتحة الزجاجة للقطارة لحين تجمد الشمع مثبتا طرف الشعرة في الأنبوبة.[(١)]

---

(١) الحميدي وآخرون (١٤١٨هـ).

تحفظ الأنشوطة الشعرية في أنبوبة اختبار لها سدادة من المطاط أوالفلين بها ثقب يثبت فيه حامل الأنشوطة الشعرية الزجاجي (الشكل رقم ١,١٣ج).



الشكل رقم (١,١٣. أ،ب). رسم يوضح طريقة عمل سحب الأنابيب الزجاجية وصنع الأنشوطة الشعرية Hair Loop وحفظ الأنشوطة في أنبوبة (ج).

ج) عمل إبرة التشريح المعدنية

يمكن عمل إبر التشريح المعدنية بإدخال سلك من التنجستن قطره ٠,٢٥ ملم وطوله يتراوح بين ٢ و٣سم بداخل قضيب زجاجي قطره ٥ ملم وطوله ١٥ سم بعمق يتراوح بين ٣ و٤ ملم، ثم يسخن طرف القضيب الزجاجي، حتي يلتحم السلك جيدا بالقضيب الزجاجي، ويمكن سن إبرة التشريح المعدنية، عن طريق غمس طرفها في محلول نترات الصوديوم المصهورة أوبطريقة التحليل الإلكتروليتي الكهربائي (Electrolytic analysis).

د) الماصات أوالأنابيب الدقيقة Micropipettes

أجهزة صنع الأنابيب والماصات الدقيقة Micropipettes Instruments

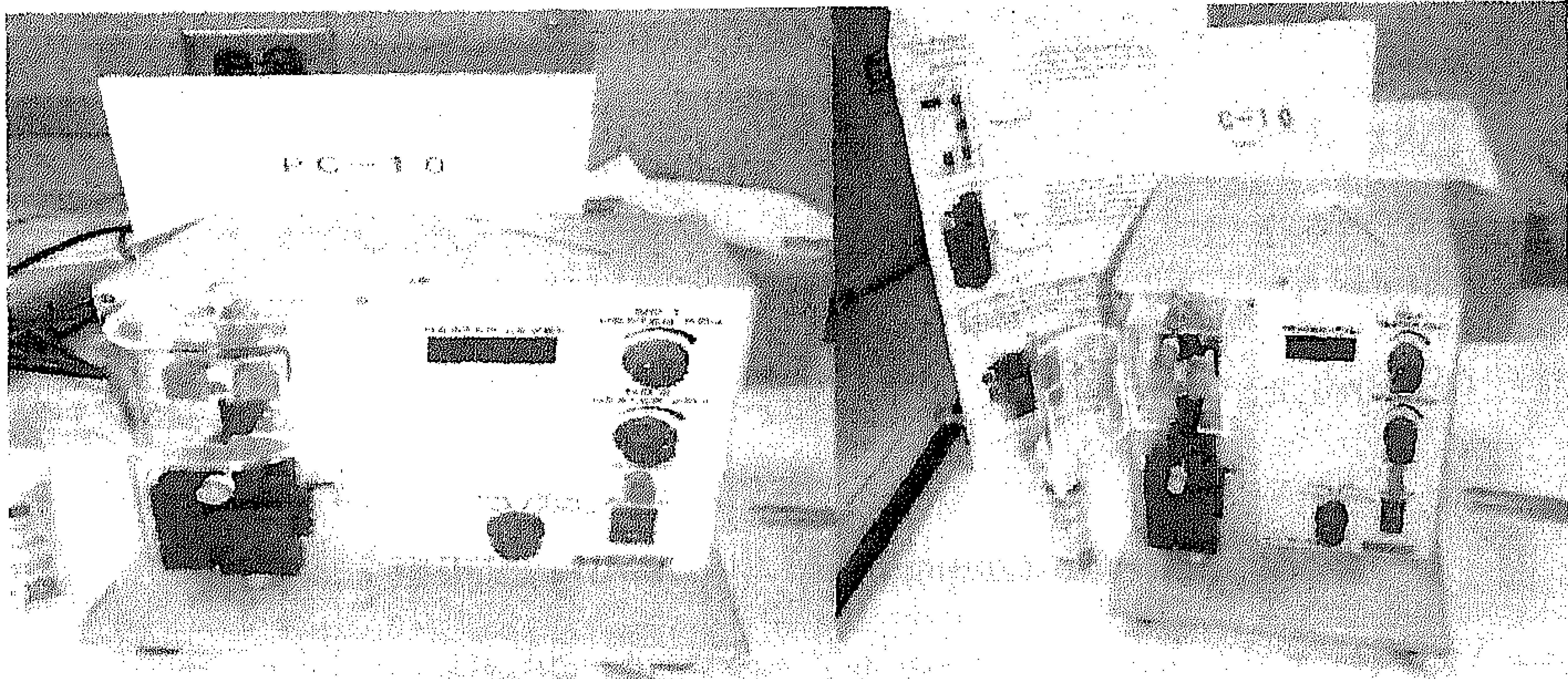
هي عبارة عن ماصات وإبر تشريح زجاجية دقيقة طولها يتراوح بين ٥-٧ سم وقطرها ١٠٠ ميكروميتر وهي أصغر قليلا من الأنابيب الوعائية أوالشعرية، تستخدم هذه

الماصات لمجهر المعالجات الدقيقة Micromanipulator مثل الحقن المجهري للحيوانات المنوية داخل البويضات، وهناك ثلاث أجهزة لتصنيع هذه الأنابيب وتشمل :

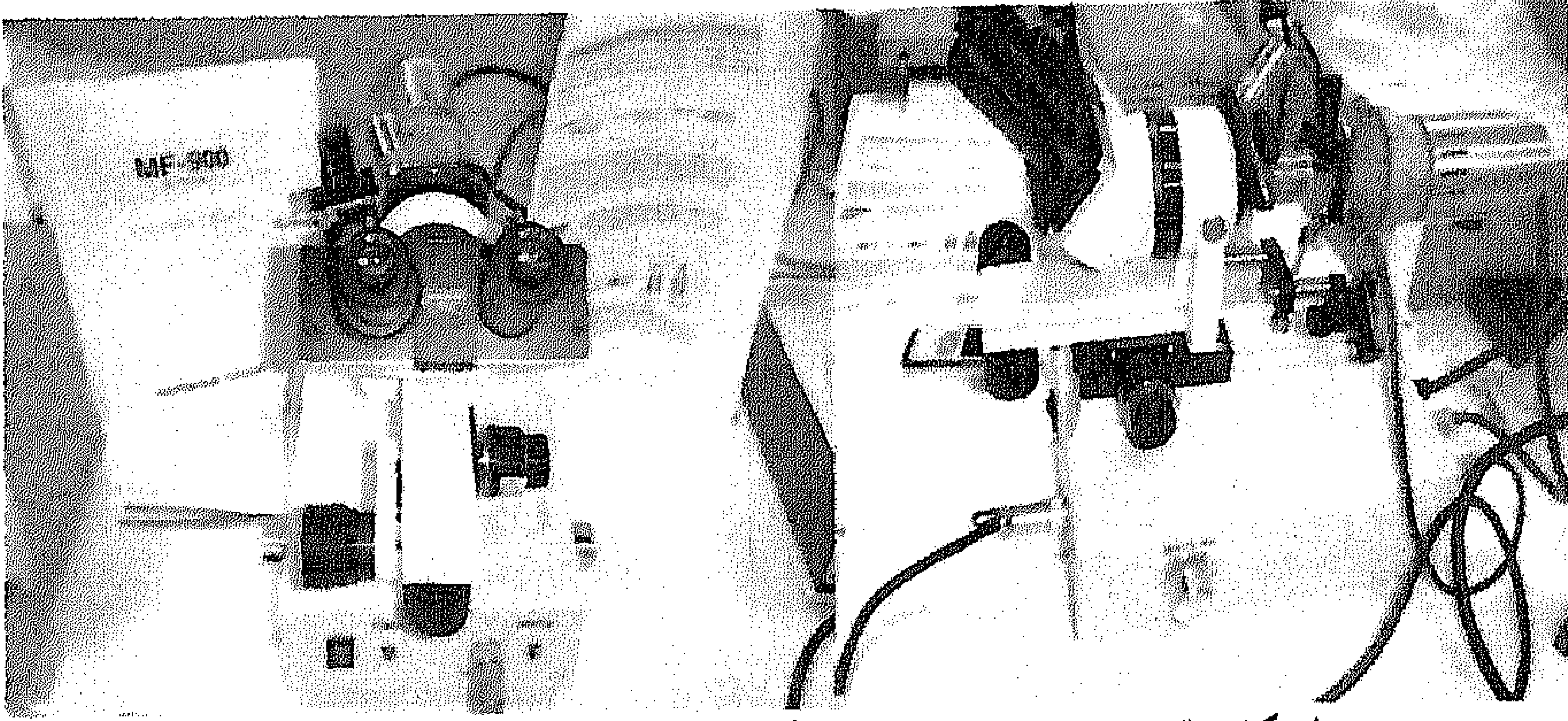
أ) **جهاز سحب الأنابيب Micro-Pipettes puller**: (الشكل١٫١٤.أ): هو جهاز مصمم لسحب الأنبوبة الشعرية (سعتها ٢٠٠ ميكرون) بحيث تعطى أنبوبة دقيقة (٢٠-٣٠ميكرون) يحتوي على فتيلة تسخين كهربائية بحيث توضع عند منتصف حامل الأنبوبة الزجاجية، وتكون حافتي الأنبوبة الزجاجية احداهما ثابتة والأخرى متحركة وعند تسخين الأنبوبة بالفتيلة تنقطع الأنبوبة بشكل دقيق جدا.

ب) **جهاز تشكيل الأنابيب الدقيقة Micro-forge**: (الشكل رقم ١٫١٤.ب): الجهاز عبارة عن مجهر مزود بحامل للأنبوبة الدقيقة ومزود بفتيلة حرارية أمام الحامل وهوجهاز يعمل على تشكيل الأنبوبة الدقيقة إلى أنابيب حقن أوأنابيب سحب أومسك الأجنة أوأنابيب تشريح للأجنة كما يمكن ثني الأنابيب بدرجة معينة بزوايا مختلفة (30° / 40°).

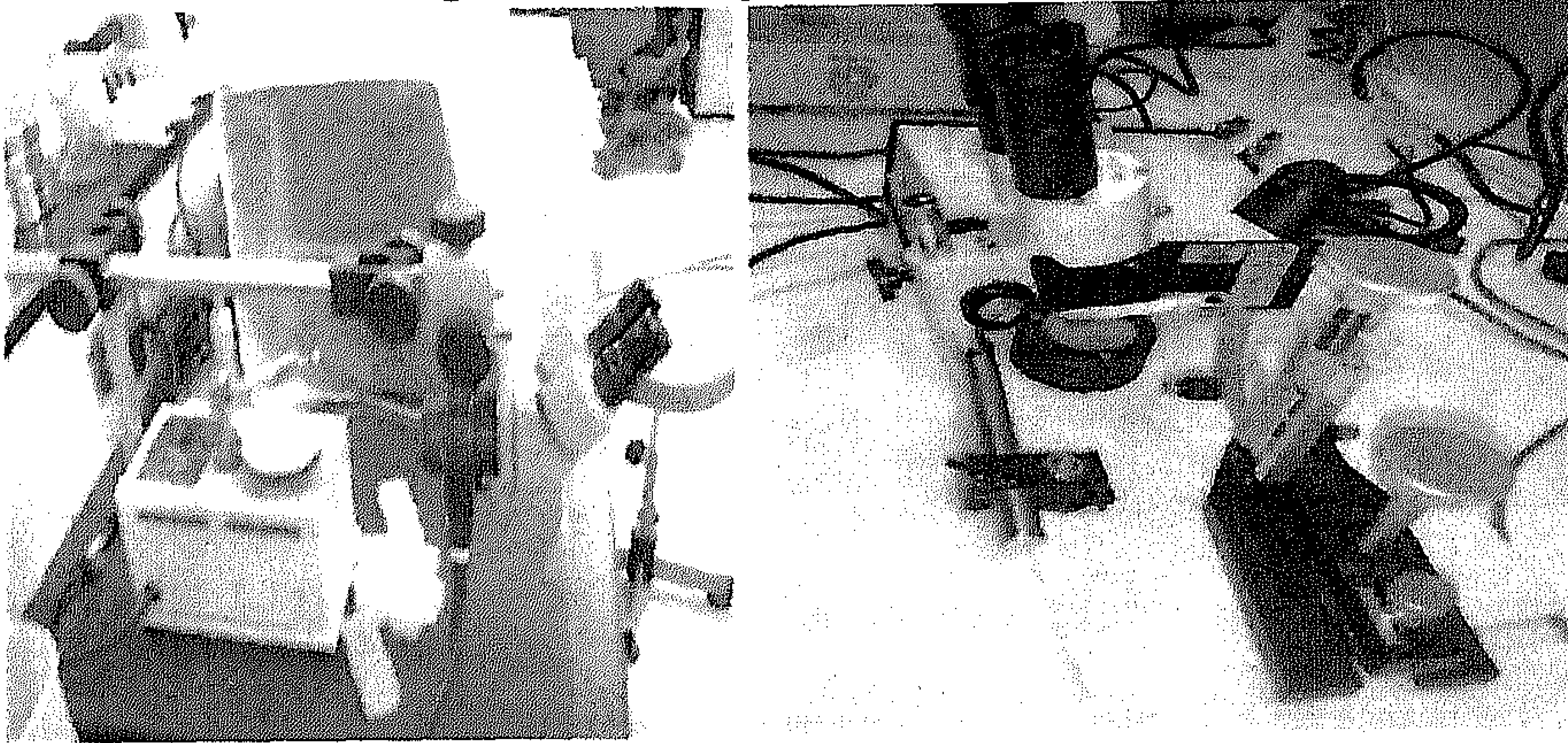
ج) **جهاز سن الأنابيب الدقيقة Micropipette grinder**: (الشكل رقم ١٫١٤.ج): هوعبارة عن رحاة على شكل قرص تدور بشكل سريع سطحها خشن أدق من ورق الصنفرة ، بحيث تثبت الأنبوبة الدقيقة بحامل سطح الرحاة ويتم النظر إليها عن طريق عدسة عينية مثبتة فوق الرحاة وبتحريك الرحاة وفوقها سن الأنبوبة الدقيقة تتم عملية برد أوسن حافة الأنبوبة الدقيقة. يتم برد وسن حافة الأنبوبة حسب الزاوية المرغوبة بواسطة هذا الجهاز.



الشكل (١٫١٤.أ). جهاز سحب الأنابيب الدقيقة Micro grinder puller.



الشكل رقم (١,١٤.ب). جهاز تشكيل الأنابيب الدقيقة Micro – forage.



الشكل رقم (١,١٤. ج). جهاز سن الأنابيب الدقيقة.

وأخيرا لابد من توافر جهاز تقطير للماء، وينقى الماء من الشوائب والأيونات لتحضير البيئات الخاصة لزراعة الخلايا وتنمية الأجنة ومن المفضل أن يكون الماء مقطراً لثلاث مرات ويكون عن طريق تركيب وحدة تقطير من الزجاج تتكون من ثلاث وحدات. أوتنقية الماء والتقطير معا (الشكل رقم ١,١٥).



الشكل رقم (١,١٥). جهاز تقطير وتنقية الماء الخالي من الأيونات.

هذه هي معظم الأدوات والأجهزة التي قد يحتاج إليها معمل زراعة الخلايا والأجنة التجريبي إلا أن كل تجربة تحتاج لترتيب معين وأدوات ومواد كيميائية وبيئات زراعية معينة سوف نتطرق لها في هذا الكتاب مع كل تجربة على حده.

تقرير العملي الأول: الأدوات والمواد المستخدمة في معمل الأجنة وعمل الأنابيب الدقيقة

اسم الطالب : .... الرقم الجامعي : ....

١- ماهي الأدوات والأجهزة المتوفرة في معمل الأجنة وما عددها؟

....

....

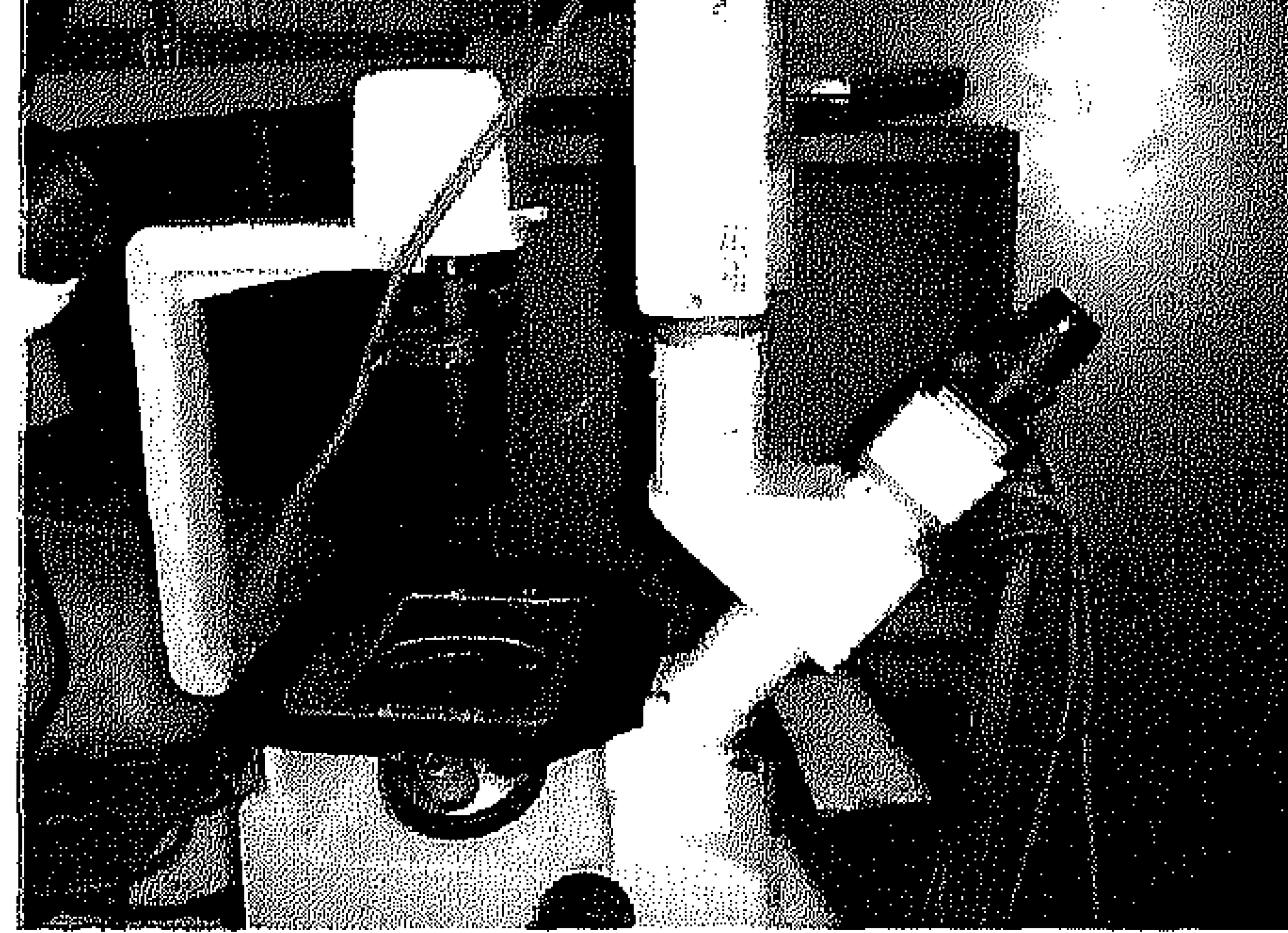
٢- ما هي الأدوات والأجهزة الخاصة بأجنة البرمائيات والطيور؟

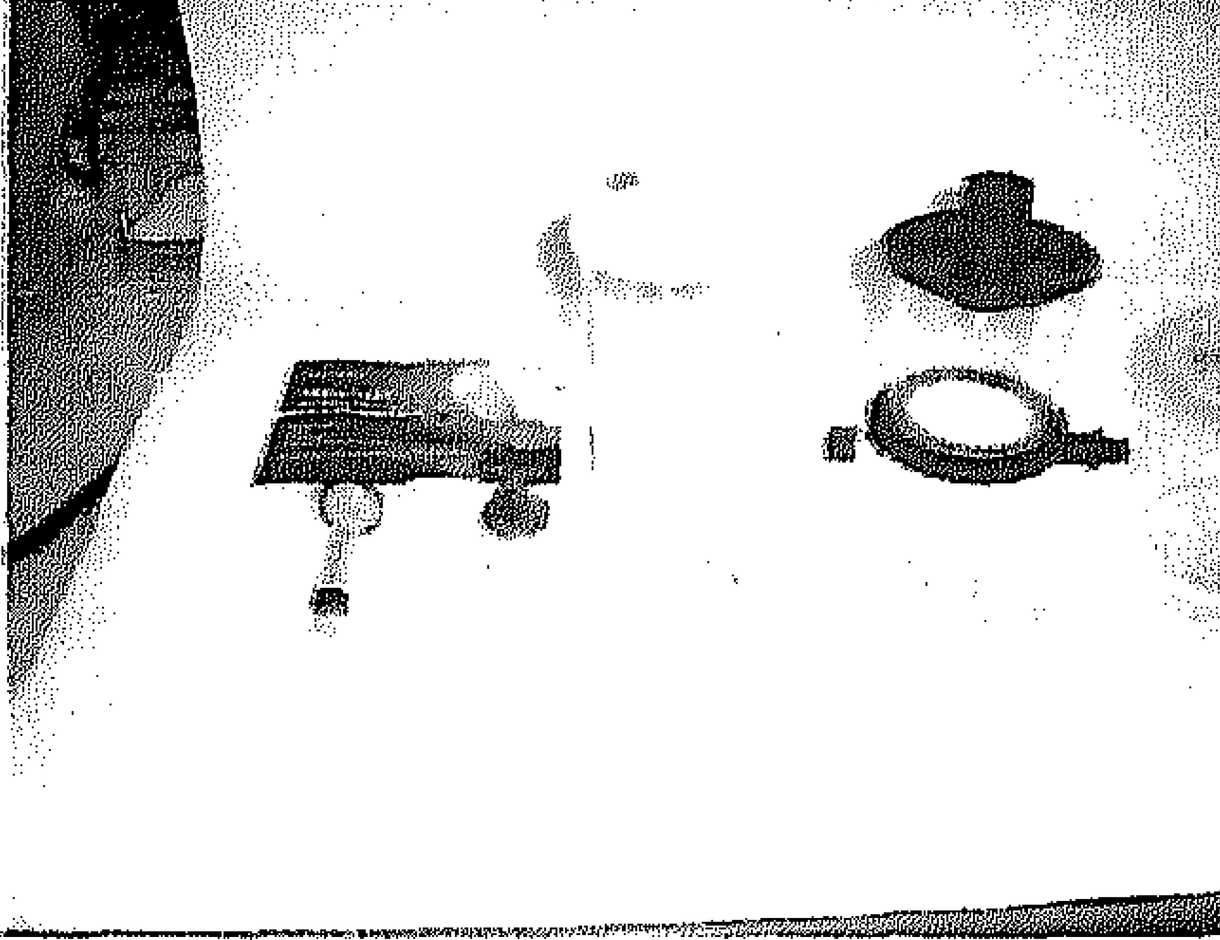
....

....

....

٣- (أ) عرف الصور المرفقة (ب) وفيمَ تستخدم كل منها؟





الصورة(أ) : ....

الصورة (ب) : ....

٤- لخص طريقة عمل الأنبوبة الزجاجية أوالأنشوطة الشعرية التي تم عملها في هذا العملي وكم أنبوبة وأنشوطة شعرية عملت وقدمتها لمدرس العملي؟

....

....

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

القسم الأول

تجارب على أجنة الضفادع

(البرمائيات)

Expriments on Frog Embryos (Amphibia)

العملي الثاني

حث إنتاج البيض ونمو الأجنة في الضفدعة(٢)

Induced Ovulation and Development of Frog Embrys

الهدف

يهدف هذا الدرس إلى تعلم طريقة حث إنتاج بويضات وأجنة البرمائيات وتنميتها تجريبيا في المعمل، ويمكن إنتاج أجنة الضفادع في المعمل عن طريق تنشيط المناسل لديها بواسطة الحقن بالهرمونات التناسلية التجارية جاهزة الصنع أو يمكن استخلاصها من الغدة النخامية للضفادع.

ولنجاح مثل هذه التجارب على الضفدعة لابد أن تكون خلال موسم التزاوج أي بداية فصل الربيع (بداية شهر فبراير إلى مارس)؛ لأن الضفدعة كما هو معلوم تكون خلال هذا الموسم قد خرجت من البيات الشتوي، كما لا تكون في موسم الصيف؛ لأنها تكون قد انتهت فترة التكاثر.

المواد والأدوات المستخدمة

١- عدد من الضفادع البالغة ذكورا وإناثا (٤ ذكور و٤ إناث).

٢- هرمونات تناسلية لتنشيط المناسل الهرمون المحفز لنمو الحويصلات (FSH Follicle stimulating hormone) وهرمون الجسم الأصفر(التبويض) أو الهرمون المشيمي التناسلي أو البشري (Luteinizing hormone LH. or Human chorionic gonadotrophin hCG).(٢)

(٢) الحميدي وآخرون ١٤١٨هـ.

٣- ثلاثة أحواض للضفادع على الأقل قطر كل منها ٣٠ سم وبعمق ١٢ سم وذات أغطية.

٤- أحواض وأطباق صغيرة لتربية الأجنة واليرقات مزودة بالهواء.

٥- ماء بركة (من أحواض التربية للضفادع) أو يمكن تحضير البيئة المناسبة للتنمية كما هو موضح في التجربة.

ملاحظة للتفريق بين الذكر والأنثى في الضفادع

تتميز ذكور الضفادع عن الإناث بتضخم الإصبع الأول لكل من الطرفين الأماميين للذكور خلال فصل التزاوج وإصدارها للأصوات بشكل أقوى لجذب الإناث. كما أن في الأنثى يكون السطح البطني للرأس لونه أبيض أو رمادي أما في الذكر فيكون لونه أسود وذلك لوجود كيس الصوت تحت الجلد الذي يغطي الفك السفلي وهذا الكيس له فتحتان في الفم، ويدخل فيه الهواء فيمتلئ حينئذ يشبه البالونه. بالإضافة للصوت النقيق الذي يصدره الذكر لجذب الإناث إليه.

أولاً:حث إنتاج البيض في الضفدعة من جنس رانا RAna بواسطة الهرمونات التناسلية جاهزة الصنع أو التجارية[٣]

يمكن الحصول على البيض بكميات كبيرة في موسم التزاوج (الربيع)، وذلك عن طريق حقن الحيوانات البالغة بكميات صغيرة ١٠٠ وحدة من الهرمون المحفز لنمو الحويصلات بالمبيض (FSH) ثم بعد يومين أو أكثر(٤٨-٦٠ ساعة) تحقن بنفس الطريقة بهرمون التبويض المشيمي التناسلي أو البشري (hCG or LH).

خطوات العمل

١- استخرج الضفادع من أماكن تربيتها واحفظها في وعاء زجاجي مستدير قطره ٣٠ سم، ثم ضع فيه الماء حتي منتصفه تماما، ولمنع هروب الحيوانات من الحوض، يوضع لوح زجاجي مثقب ثقيل أو شبك من السلك مع ثقل لتغطية الوعاء.

---

(٣) الحميدي وآخرون ١٤١٨هـ.

٢- يجب وضع الوعاء في مكان مناسب ومطابق للمكان الذي وجدت فيه، كما يجب أن تكون درجة الحرارة مناسبة (٢٠-٢٥م°).

٣- بعد اختيار زوجين من الضفادع الذكور والإناث كبيرة الحجم نوعا ما ضعهما مباشرة في الوعاء الزجاجي وامنع عنهما الغذاء لمدة ٢٤ ساعة قبل عملية الحقن.

إذا تطلب الدرس العملي أكثر من زوج للحقن من أجل الحصول على كمية وافرة من البيض، فيمكن على أقل تقدير حقن ثلاثة أو أربعة أزواج.

٤- بعد انتهاء مدة المنع عن الغذاء (التجويع) وقبل عملية الحقن، يجب تغيير ماء الوعاء في الحال.

٥- للحصول على البيض، يجب حقن كل حيوان على حدة مرتين خلال ٢٤ ساعة، ففي المرة الأولى تعطى الأنثى ١٠٠ وحدة من الهرمون المنشط للمنسل(FSH) ويعطى الذكر ٥٠ وحدة من الهرمون نفسه. أما في المرة الثانية فيجب مضاعفة الجرعة بمعنى أن تعطي الأنثى ٢٠٠ وحدة والذكر ١٠٠ وحدة. هذه الكمية مناسبة للحيوانات ذات الحجم العادي، أما الحيوانات الكبيرة فتزاد الكمية بنسبة ٢٠٪ ثم إذا لم ينزل البيض بعد ٤٨ ساعة يمكن حقن الإناث فقط بهرمون السلي التناسلي بكمية ١٠٠ وحدة دولية لمرة واحدة. ويمكن توقع أن ينزل البيض بعد ٢٤ ساعة.

٦- يجب إذابة الهرمون في ماء مقطر ومعقم.كمية الماء المستخدم يجب حسابها لحقن كل حيوان على حدة ٠,٥ مل، ومزود بإبرة من الحجم ٢١ج (21G) طولها ١,٥ بوصة. ويتم حقن الهرمون في الفراغ اللمفي الظهري (Dorsal Lymphatic space) ويمكن إجراء ذلك على النحو التالي:

أ) أمسك الضفدعة باليد اليسرى بحيث يلتف الإبهام والأصابع الأربعة الأخرى حول الرجل اليسرى الخلفية وراحة اليد محيطة بجسمها، والغرض من ذلك هو إظهار الجزء العلوي من الرجل والمنطقة الجلدية الملاصقة لها التي تغطي الفراغ اللمفي الظهري (الشكل رقم ٢,١).

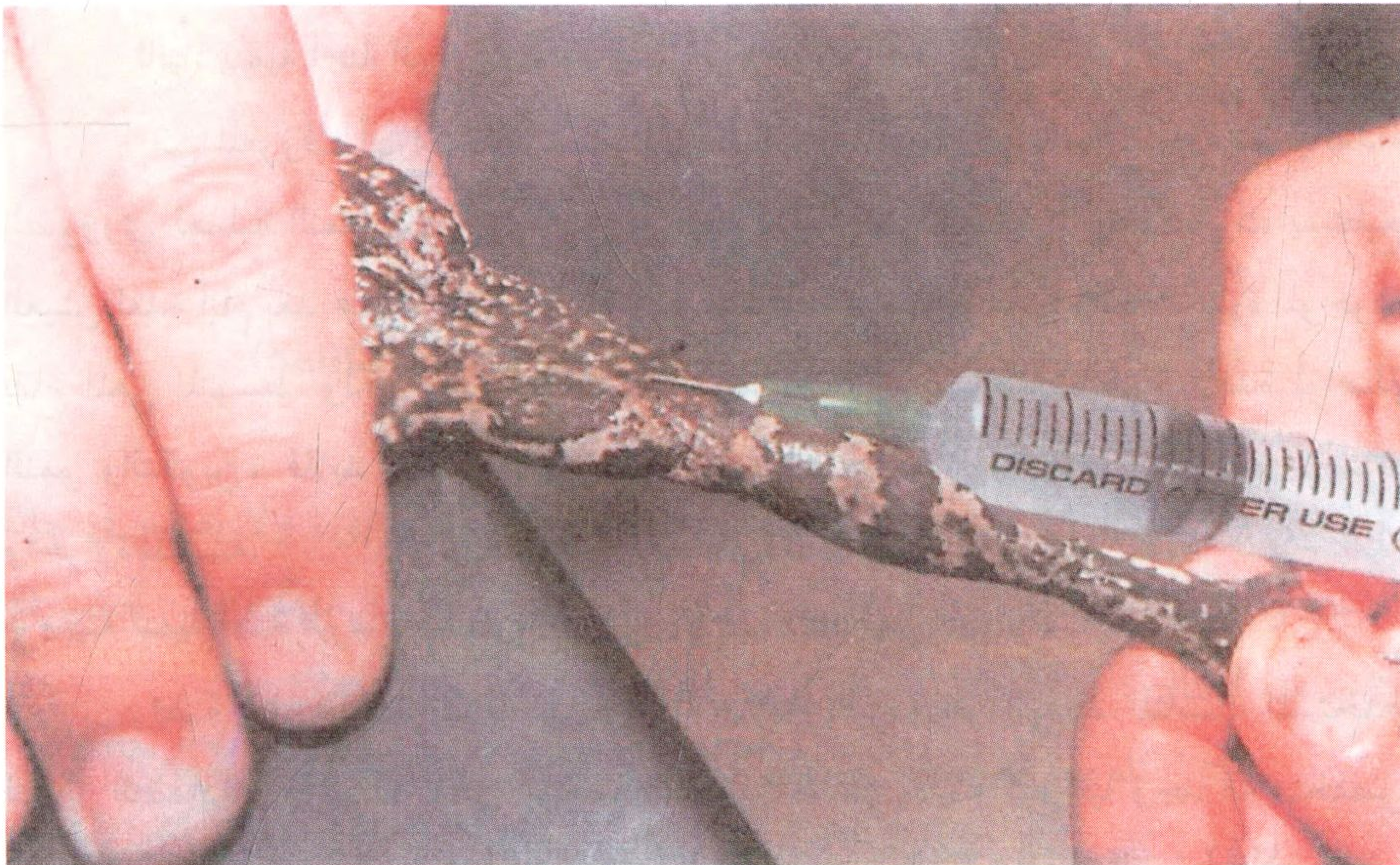
ب) ثبت السطح البطني للحيوان على قطعة القماش، ثم أمسك الطرف السفلي للرجل اليسرى باليد اليمنى بإحكام وثبتها جيدا باستعمال جزء من القماش نفسه.

ج) تأكد من أن راحة اليد اليسرى تغطي الجزء العلوي من جسم الحيوان ورأسه لمنعه من الهرب.

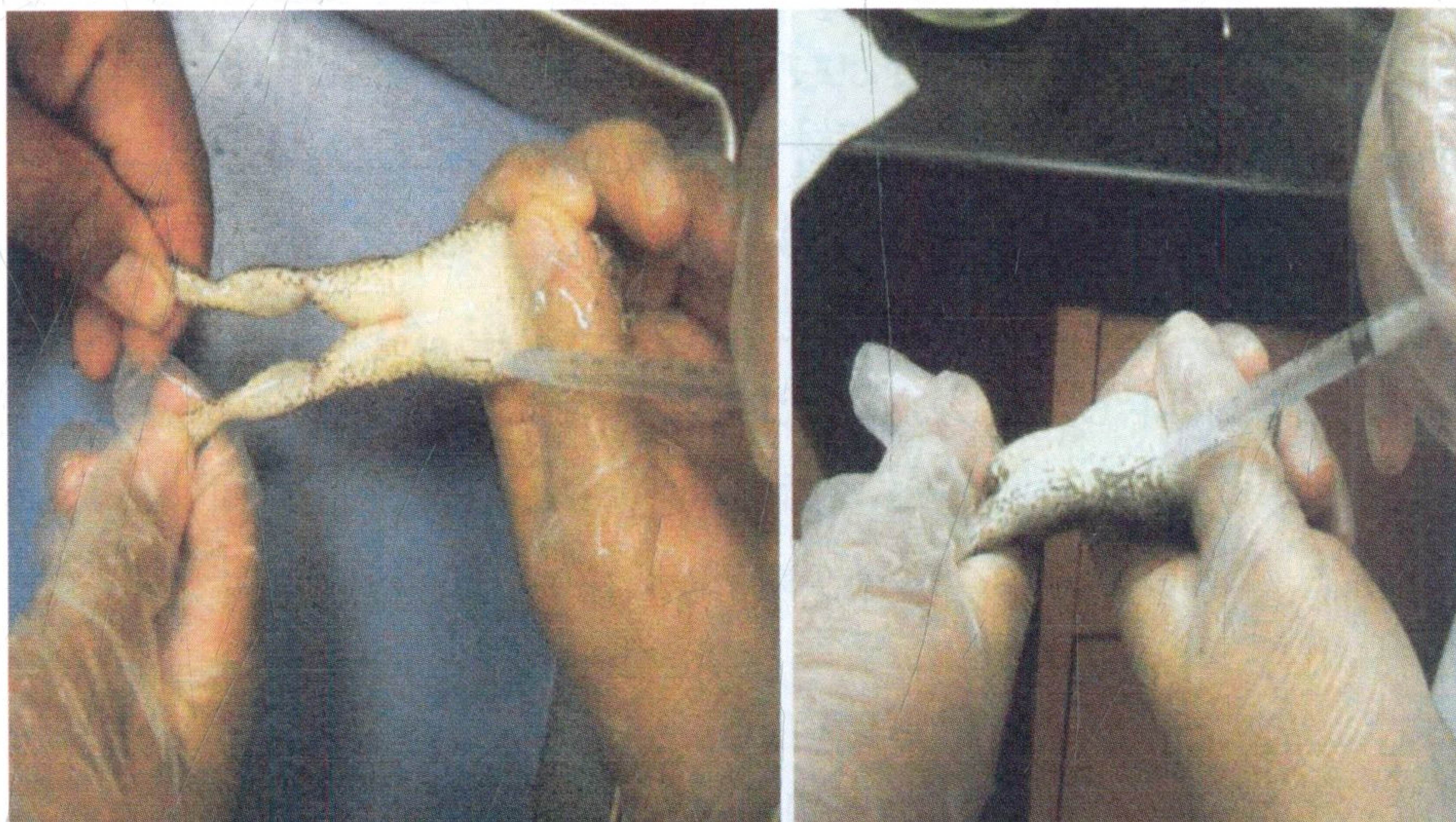
د) أدخل الإبرة تحت الجلد عند منتصف طول الفخذ مع محاولة تفادي العضلات في هذه المنطقة، ثم ادفع الإبرة إلى الأمام بلطف تحت سطح الجلد، واستمر حتى تصل إلى الفراغ اللمفي الظهري، أثناء ذلك يمكن مشاهدة تقدم الإبرة وتحديد موقع طرفها. يجب أن تخترق الإبرة الفراغ اللمفي بعمق ١سم وتكون دائما سطحية وبعيدة عن العمود الفقري، وعند الانتهاء من الحقن ضع الإصبع على مكان اختراق الإبرة ثم اسحبها ببطء شديد لمنع فقدان السوائل عند إزالتها. يظهر الحقن الجيد انتفاخا واحمرارا في منطقة المذرق بعد الجرعة الأولى وعندما يستجيب كل من الذكر والأنثى يمتطي الذكر الأنثى، ويمسك بها بطرفيه الأماميين، وبعد ساعات من الجرعة الثانية تضع الأنثى البيض في صباح اليوم التالي وفي الوقت نفسه يقذف عليه الذكر سائله المنوي.

تضع الأنثى الناضجة أكثر من ألف بيضة في المرة الأولى، إلا أن هذه الكمية تزداد إلى ٥٠٠٠ أو ٦٠٠٠ بيضة ويمكن حقن هذه الإناث مرة أخري بعد ٦ أسابيع ويستحسن تركها لمدة ثلاثة شهور قبل إنتاج البيض مرة أخرى. يجمع البيض بعد حوالي نصف ساعة من وضعه لتتم عملية الإخصاب كما يتم تغذية الأبوين. وعند جمع البيض يلاحظ أن الموضوع منه حديثا يلتصق بالزجاج، لذا فيجب نزعه بلطف بواسطة ملقط مدبب الطرفين (رقيق) وتوخي الحرص عند نقله حتى لايتلف. ويمكن إزالة البيض بواسطة ماصة لها فتحة واسعة لتلافي الضرر، ويلاحظ أن الأغشية الجيلاتينية المحيطة بالبيض شفافة بالقدر الذي يسمح من فحص البيض تحت المجهر التشريحي حيث يمكن رؤية أطوار الانقسام جيدا وذلك باستعمال إضاءة علوية تسلط عليها وخلفية سوداء (قطعة من الورق الأسود توضع على مسرح المجهر).

ويجب ملاحظة أن البيض غير المخصب والتالف ينتفخ ويصبح أبيض اللون ولذلك يجب إزالته؛ لأن وجوده بأعداد كبيرة يفسد الماء ويدمر أحواض التربية نظرا لما ينمو عليه من كائنات دقيقة، ومما يجدر ذكره أنه يمكن حقن الهرمون في الجزء الجانبي للتجويف البطني، (الشكل رقم ٢,٢).



الشكل رقم (١,٢). صورة طريقة إمساك الضفدعة وحقنها في الفراغ اللمفي الظهري.



الشكل رقم (٢,٢). صورة توضح طريقة إمساك الضفدعة وحقنها في الجزء الجانبي للتجويف البطني.

ثانياً: تنمية أجنة البرمائيات ويرقاتها حتي عملية التحول (الشكل رقم ٢,٣)

من المعروف أن الأجنة المبكرة للبرمائيات بها كمية كبيرة من المح تمدها بالغذاء الضروري لعملية النمو والتطور. وطور أبو ذنيبة لكل من الذيليات واللاذيليات يستطيع العيش لعدة أيام بعد عملية الفقس؛ نظرا لوجود المح مخزنا في الخلايا المحية الكبيرة الموجودة بقاع المعي المتوسط. ولكي تبقى الأجنة على قيد الحياة، خصوصا الأطوار المعدة لمواصلة النمو والتكوين، فلابد لها من توفر عدة عوامل هي: البيئة والتهوية والمكان والإضاءة والحرارة المناسبة.

أ) بيئة تنمية أجنة البرمائيات Culture Medium of Frog Embryo (٤)

تضع كل البرمائيات بيضها في الماء، وماء البركة هو الوسط المناسب المستخدم لتكاثر الضفادع، ولكن لا يمكن استعماله معمليا، وعند تحليله كيميائيا وجد أنه منخفض التوتر (Hypotonic) حتى الماء المقطر لا يمكن استخدامه بسبب ظاهرة الضغط الأسموزي غير المتوازن. أما ماء الصنبور، فإنه يحتوي على تركيز عالٍ من الكلور المسمم للأجنة، كما توجد به بعض الأيونات المعدنية، مثل الرصاص والنحاس والحديد، مما قد يؤثر على بقاء الأجنة. غير أنه عندما نرشح ماء الصنبور بإمراره في خليط من الرمل والفحم الحجري ثم نترك الرشيح لعدة أيام مع تزويده بالنباتات المائية، فإنه في هذه الحالة يمكن استعماله لغرض التربية. ومن النباتات المستخدمة في ذلك الإيلوديا والنتيلا (Elodea and Nitella). ونظرا لأن مثل هذه النباتات تقوم بعملية التمثيل الضوئي، فإنها تساعد على زيادة كمية الأكسيجين في الماء (ويمكن بطريقة أخرى تهوية الحوض بواسطة أجهزة التهوية). وحتى تتطور الأجنة طبيعيا، فلابد من وجود عناصر الصوديوم والكالسيوم والبوتاسيوم بماء أحواض التربية.

ومن المحاليل التي تعتبر كبيئات تستخدم في التربية نذكر منها ما يأتي: (٤)

١ – محلول هولتفرتير القياسي Standard Holtfreter's solution

يعتبر هذا المحلول من أفضل الأوساط لتربية الأجنة، إذ تبلغ نسبة المحتوي الملحي فيه حوالي ٠,٣٨٥٪، وهو محلول منخفض التوتر، ولذلك لايصلح للأجنة الكبيرة ولكن متساوي التوتر منه (Isotonic) يصلح في حالة الأطوار المبكرة لأجنة اللاذيليات، ويمكن تحضير لتر واحد منه كالآتي:

(٤) Rugh (1962).

مكونات محلول هولتفرتير القياسي متساوي التركيز:

١- كلوريد الصوديوم ٣,٥ جم (NaCl 3.5g).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,٠٥ جم (KCl 0.05g).

٣- كلوريد الكالسيوم ٠,١ جم ($CaCl_2$ 0.1g).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٢ جم ($NaHCO_3$ (Burrer) 0.2g).

٥- ماء مقطر ١ لتر (Distilled water 1L).

وهناك محلول عالي التوتر (Hypertonic) من المحلول السابق، ولا يصلح في حالة الأجنة والأنسجة الجنينية، إلا أنه مناسب للأطوار الأكبر من البرمائيات، ويمكن تحضير لتر واحد منه كالتالي:

١- كلوريد الصوديوم ٦,٦٠ جم (NaCl 6.6g).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,١٥ جم (KCl 0.15g).

٣- كلوريد الكالسيوم ٠,١٥ جم ($CaCl_2$ 0.15g).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٣٠ جم ($NaHCO_3$ (Burrer) 0.30g).

٥- ماء مقطر ١ لتر (Distilled water 1L).

ويجب أن يكون الأس الهيدروجيني لهذه البيئة ٧,٨ (pH=7.8)، ويمكن المحافظة على الأس الهيدروجيني بإضافة كمية قليلة جدا من كربونات الصوديوم.

٢- محلول رنجر الأصلي Original Ringer's solution

ويمكن تحضير لتر واحد منه كالتالي:

١- كلوريد الصوديوم ٦,٥٠ جم (NaCl 6.50g).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,١٤ جم (KCl 0.14g).

٣- كلوريد الكالسيوم ٠,١٢ جم ($CaCl_2$ 0.12g).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٢٠ جم ($NaHCO_3$ (Burrer) 0.20g).

٥- فوسفات الصوديوم المائية ٠,٠١ جم (NaH_2PO_4 0.01g).

٦- سكر الجلوكوز ٢,٠٠ جم (Glucose 2.00g).

٥- ماء مقطر ١ لتر (Distilled water 1L).

ويراعى عند تحضير الوسط المستخدم لتربية الأجنة استعمال ماء مقطر في آنية زجاجية وشروط التعقيم.

تغذية اليرقات: ليس من الضروري تغذية أطوار أبو ذنيبة التي تكونت لها فتحة الفم لعدة أيام؛ لأن يرقات البرمائيات يكون لديها مخزون من المح الذي يهضم ثم يمتص مباشرة بواسطة الأنسجة الخاصة بها. والغذاء في حالة أجنة البرمائيات اللاذيلية (Anura) ليس ضروريا حتى طور الغطاء الخيشومي الكامل بالنسبة للجنس رانا (Rana). ومن المعروف أن معظم يرقات اللاذيليات تعتبر حيوانات عاشبة (Herbivorous)، الغذاء المناسب لها يتكون من أوراق نبات الخس أو السبانخ المغلية قليلا، ويجب غسل هذه النباتات جيدا بالماء، للتخلص من المواد السامة الملتصقة بها (مثل الرصاص الذي يدخل في تركيب بعض المبيدات الحشرية). كما أن غلي هذه النباتات مفضل حتى تصبح أنسجة الأوراق طرية خاصة بالنسبة للأطوار التي تكونت لها بعض الأسنان القرنية.

ولتجنب الأخطار الناتجة عن تراكم بقايا الغذاء والمواد البرازية وما بها من بكتريا، فإنه يجب تنظيف الأحواض يوميا للتخلص منها. ويمكن استخدام الغذاء النباتي هذا إلى مابعد التحول اليرقي (Metamorphosis). وفي المراحل الأخيرة من هذه العملية تتحول اليرقات المتحولة إلى متنوعة التغذية (Omnivorous)، ثم تتحول بصورة تدريجية إلى حيوانات لاحمة (Carnivorous).

وللحصول علي نتائج جيدة يوضع الغذاء مرتين في الأسبوع. كما يجب أن يكون عدد الحيوانات ١٠ لكل لتر واحد من البيئة حتى تنمو بصورة جيدة. عند نهاية التحول، تتوقف الحيوانات عن الغذاء وتصبح غير نشطة، وعندها يجب نقلها إلى ماء ضحل عمقه ٥ سم. وتتغذي صغار الضفادع علي بعض يرقات الحشرات لمدة ثلاثة شهور، بعدها تتحول تدريجيا إلى التغذي على القلب أو الكبد البقري المفروم (قطع صغيرة مكعبة ٥ ملم). وفي الأحوال العادية تصبح الحيوانات بالغة خلال مدة تتراوح بين سنة إلى ١٨ شهرا تقريبا.

ب) عامل المكان والتهوية Space and Aeration Factor (٥)

يؤدي الحيز دورا مهما في سرعة نمو الحيوانات، فكلما كان عدد اليرقات قليلا، زادت سرعة النمو. تحتاج البيضة الواحدة إلى ٢ مل من بيئة التربية في الأطباق الصغيرة،

---

(٥) Rugh (1962).

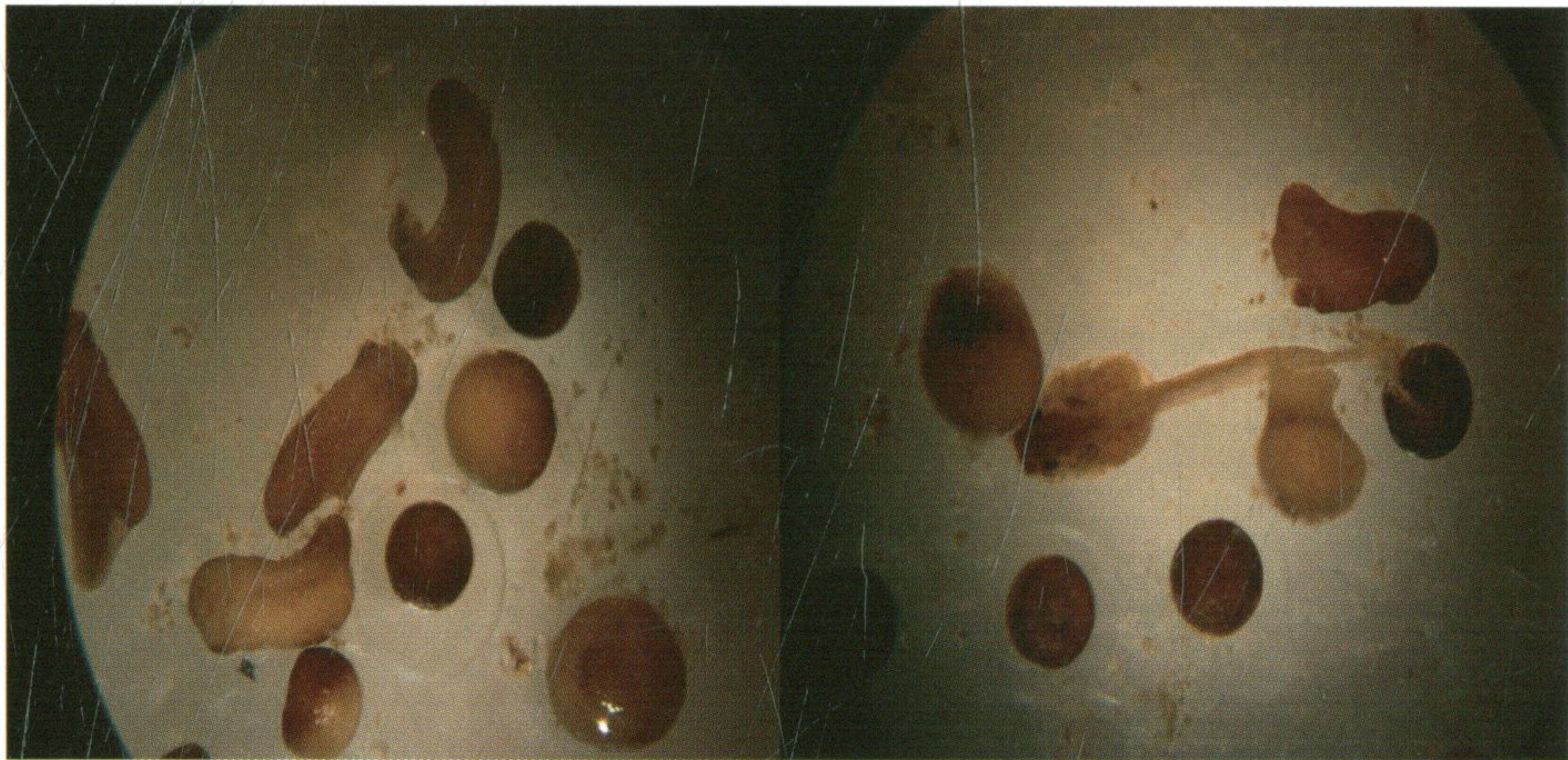
ولذلك فإن الخمس والعشرون بيضة تحتاج إلى ٥٠ مل من البيئة، عند ظهور طور أبو ذنيبة نضع في الحوض الذي أبعاده تقريبا (٦×١٢×٢٤ بوصة) والذي يحتوي على ١٠ لترات من الماء، ٢٠٠ عينة من يرقات أبو ذنيبة. ويكون ارتفاع الماء فيه ١ بوصة ويجب إضافة الماء كل أسبوع إلى الحوض لتعويض الفاقد منه نتيجة للتبخر. وليس من الضروري عمل تهوية صناعية (Artificial aeration) ولكن من الأفضل وضع بعض النباتات المائية مثل الإيلوديا والنتيلا (Elodea,Nitella) لكي تمد الوسط بكمية مناسبة من الأكسيجين، إذ إن يرقات اللاذيليات تحتاج إلى كميات كبيرة منه.(٥،٣)

ج) الإضاءة Light

الضوء ليس ضروريا للتطور الطبيعي للبرمائيات. ولكن عندما تعتمد اليرقات في غذائها على الطحالب المائية التي تمدها في الوقت نفسه بالأكسجين، فلابد من وجود ضوء طبيعي لنمو النباتات وللحصول على الكمية المناسبة من الأكسيجين، ويعتبر ضوء الشمس المباشر ليس مستحبا نظرا لشدة حرارته.

د) الحرارة Temperature

تبلغ درجة الحرارة القصوى ليرقات البرمائيات حوالي ٤٠°م، بينما تتراوح درجة الحرارة المثلى مابين ١٢– ٢٥°م. بعض المعامل تحتفظ بالحيوانات عند حرارة ٢٣ – ٢٥°م، وهذه الدرجة مناسبة للاذيليات (Anura)، إلا أنها تعتبر مرتفعة بالنسبة للذيليات (Urodela).



الشكل رقم (٢،٣). مجموعة من أجنة الضفدعة في أطوار مختلفة من النمو.

تقرير العملي الثاني: حث إنتاج البيض ونموالأجنة في الضفدعة

الاسم : .... الرقم : ....

١- ما اسم الهرمونات المستخدمة في التجربة؟

....

٢- ما تركيز الهرمون المحقون في كل مرة وكم مرة تم حقن الضفدعة؟

....

٣- كم عدد الحيوانات التي حقنت ؟ ذكور : .... إناث : ....

٤- متى بدأت عملية خروج البويضات من الإناث (من ساعة الحقن)؟

....

٥- هل كان هناك تزاوج بين الذكور والإناث؟ .... نعم .... لا

٦- كم يقدر عدد البيض الناتج؟............. بيضة /هل هو محاط بالأغشية؟.....................

٧- هل تكونت أجنة في التجربة ؟إذا كانت الإجابة بنعم/ أو لا انتقل إلى السؤال رقم ٨ :

....

أ) إلى أي عمر أو مرحلة وصلت الأجنة في التجربة؟

....

ب) ما عدد الأجنة النامية ؟...

٨- إذا لم تتكون أجنة أو لم تنمو ، اذكر الأسباب التي أدت إلى عدم تكونها ؟

....

....

اذكر أنواع البيئات التي استخدمت في تنمية الأجنة أو تربية الأطوار اليرقية.

....

....

ما الشروط الواجب مراعاتها عند تغذية اليرقات:

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الثالث

تنشيط التبويض في الضفدعة بمستخلص الغدة النخامية [٦]

Superovulation of Frog via Pituitary Gland Extract

الهدف

إن التعبير Induced spawning يعني حث عملية التبويض بالطرق التجريبية وتحت الظروف المخبرية وذلك في غير موسم التزاوج ونظرا لأن في التجربة السابقة تم استخدام الهرمونات التجارية والتي أحيانا قد لا تستجيب البرمائيات للحقن بالهرمونات جاهزة الصنع؛ لأنها غالبا استخلصت من الثدييات، لذا سوف يتم في هذا العملي حقن الضفادع بهرمونات من محلول مستخلص الغدة النخامية والذي يتم تحضيره كما يلي:

مستلزمات التجربة Material

١- ذكور وإناث ضفادع من جنس Rana (١٠ ذكور، ١٠ إناث بالغة).
٢- حقن للحقن تحت الجلد سعتها ٢ سم^3 وقياسها ١٨-ج (18G).
٣- أدوات تشريح.
٤- أطباق صغيرة وأحواض.
٥- ماء بركة وبيئات زراعية (Culture media).

---

(٦) Rugh (1956).

لإجراء التجربة يجب مراعاة الملاحظات التالية

١- يجب أن تكون الحيوانات المستخدمة في التجربة ناضجة جنسيا وألا يقل طول جسم الإناث عن ٧٤ ملم والذكور عن٦٥ ملم، وذلك بدءا من مقدم الخطم أو البوز إلى فتحة الشرج.

٢- يفضل أخذ الحيوانات أثناء البيات الشتوي ويجب أن تغذى جيدا فبل التجارب المعملية.(٧)

٣- يتم الحقن في الجزء الجانبي الخلفي من التجويف البطني، ويكون اتجاه الحقن إلى الخلف لتجنب إحداث الضرر بالأوردة الجلدية الكبيرة والوريد البطني الأمامي والأعضاء الداخلية، (الشكل رقم ٢,٢ في العملي السابق).

٤- وتستخدم الغدد النخامية المستخرجة حديثا لحقن كل من الذكور والإناث على حدة.

يختلف عدد الغدد النخامية الضروري لإحداث التبويض الكامل من فصل إلى آخر.

الجدول الآتي يوضح عدد الغدد النخامية اللازمة لحقن الضفادع من جنس رانا حسب شهور السنة الميلادية:

الشهور	عدد الغدد النخامية للإناث	عدد الغدد النخامية للذكور
من سبتمبر إلى يناير	٥	٤
من يناير إلى فبراير	٤	٨
مارس	٣	٥
أبريل	٢	٤

٥- يمكن حفظ إناث الضفادع التي تم الحصول عليها من البيات الشتوي معمليا في الثلاجة مع قليل من الماء عند درجة حرارة ٤ °م لعدة أسابيع بل لعدة أشهر من يناير حتى يونيو، ولكن لا يمكن حفظها في درجة حرارة المعمل لأكثر من أسبوع واحد حتى لايفسد البيض الموجود داخل المبيض. وهذا يعني عدم ترك إناث الضفادع لفترات طويلة في درجة حرارة المعمل قبل الحقن لإحداث عملية التبويض في مواسم البيات الشتوي. (لذلك فإننا نستطيع التحكم في وقت التبويض بواسطة درجات الحرارة). (٧)

---

(٧) Rugh(1956).

٦- إذا أردت الحصول على بيض الضفادع بعد ٢٤-٤٨ ساعة فيجب بعد حقن الإناث بمستخلص الغدد النخامية الاحتفاظ بها عند درجة حرارة ٢٥°م، أما إذا كنت لاتحتاج للبيض إلا بعد ٤-٥ أيام، فيجب الاحتفاظ بها عند درجة ١٠ مْ.

٧- درجة الحرارة المثلى لنمو بيض الضفادع من جنس Rana تتراوح ما بين ١٨-٢٥°م ويكون النمو غير الطبيعي عند درجة حرارة أقل من ١٠ مْ. كما يجب عدم نقل البيض أو الأجنة من درجة حرارة معينة إلى درجة حرارة أخرى فجأة لتجنب حدوث صدمة حرارية.

اختبار حدوث التبويض

تستطيع تقرير وجود البيض داخل كيس البيض من عدمه وذلك بالضغط على مؤخرة بطن الضفدعة أو تدليكه لاستخلاص البيض، ويكون ذلك بلطف حتى لا تلحق الضرر بالبيض وبالضفادع نفسها، وتتم هذه العملية خلال ٢٤ ساعة بعد الحقن على النحو التالي:

• أمسك أرجل الضفدعة باليد اليسرى.

• أثنى جسم الضفدعة على منطقة الحوض، وذلك بوضع راحة اليد اليمنى على ظهرها والأصابع تكون محيطة بالجسم خلف الأطراف الأمامية تماما فتتكون زاوية بين الجذع والأرجل.

• أغلق اليد اليمنى بلطف باتجاه المذرق. ويجب التخلص من كمية البيض التي تخرج أول مرة؛ لأنها تكون متلاصقة لسوائل المذرق التي قد تسبب انتفاخا في الأغشية الجيلاتينية المحيطة به، مما قد يعيق عملية الإخصاب، كما يجب أيضا تجفيف منطقة المذرق قبل عملية التدليك.

•نسبة الإخصاب تكون عالية عندما يمكث البيض داخل الأنثى لمدة ٢٤ ساعة قبل عملية التدليك، وذلك لوجود سوائل فسيولوجية تعمل على نضجه أثناء وجوده داخل كيس البيض.

• كل أنثى ناضجة من جنس رانا Rana تعطي تقريبا ٢٠٠٠ بيضة تكون كلها في الطور الاستوائي من انقسام النضج الثاني وجاهزة للإخصاب.

يجب التأكد من المحلول المستخدم في عمل معلق الحيوانات المنوية من حيث قدرته على إبقائها على قيد الحياة من عدمه.

طريقة عمل التجربة Method

استخراج الغدة النخامية من إناث وذكور الضفادع على النحو التالي، (الشكل رقم ١ ,٣).

أولاً: استخراج الغدد النخامية من الإناث ومعاملتها

١- خدر الضفدعة بالكلوروفورم أو بالإثير (داخل زجاجة محكمة الغلق)، ثم ثبتها في طبق التشريح بالدبابيس بحيث يكون سطحها الظهري إلى أعلى.

٢- أدخل المقص إلى زاوية التقاء الفك العلوي بالسفلي، ثم اعمل قطاعا وسطيا مستعرضا خلفيا، ثم كرر هذه العملية من الجهة الأخرى للرأس للتخلص من الفك السفلي وقاع التجويف البلعومي.

٣- اعمل قطاعا مستعرضا في المنطقة القذالية (Occipital region) للرأس موازيا للغشاءين الطبليين، ثم افصل الرأس عن بقية أجزاء الجسم.

٤- ثبت الجمجمة بحيث يكون سطحها البطني إلى أعلى، وسطحها الظهري ملامسا لطبق التشريح.

٥- اعمل قطاعا طوليا مستعرضا في منطقة العظم القذالي القاعدي (Basioccipital (bone، وذلك بإدخال أحد طرفي المقص في الثقب الكبير للجمجمة (foramen magnum).

٦- اضغط على الفك العلوي للجمجمة إلى أسفل تجاه طبق التشريح، وليكن الضغط من على جانبي القطع، حتي يظهر لك التصالب البصري، ثم انظر أسفل التصالب البصري لتجد موقع الغدة النخامية.

٧- اسحب الغدد النخامية لأربع ضفادع إناث، وضعها في ١سم^{٣} من محلول ملحي متساوي التركيز (٠,٩٪ كلوريد الصوديوم).

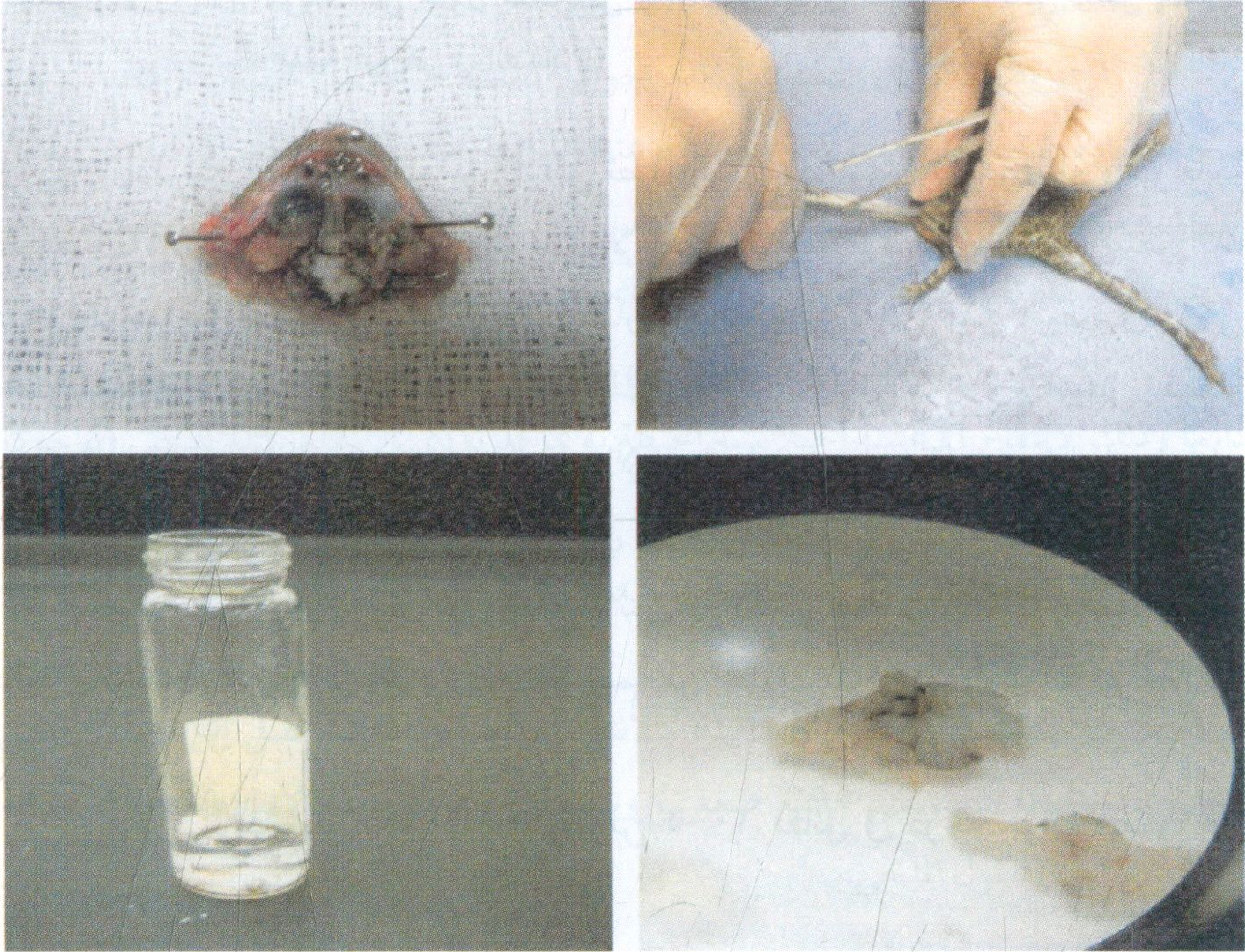
٨- اسحق الغدد النخامية الأربع التي تحصلت عليها سابقا سحقا جيدا لنشر محتوياتها في المحلول الملحي، ثم اسحب غدد الإناث مع المحلول بواسطة حقنة حجمها ٢سم^{٣}، ثم ركب عليها بعد ذلك إبرة ذات مقاس (رقم ١٨).

٩- أمسك الضفدعة من الرجل الخلفية، ثم قم بعملية الحقن في الجزء الجانبي الخلفي من التجويف البطني(التجويف البريتوني) ويكون اتجاه الحقن إلى الخلف مع تجنب إحداث الضرر بأي من الأوعية الدموية والأعضاء الداخلية، (الشكل رقم ٣,٢).

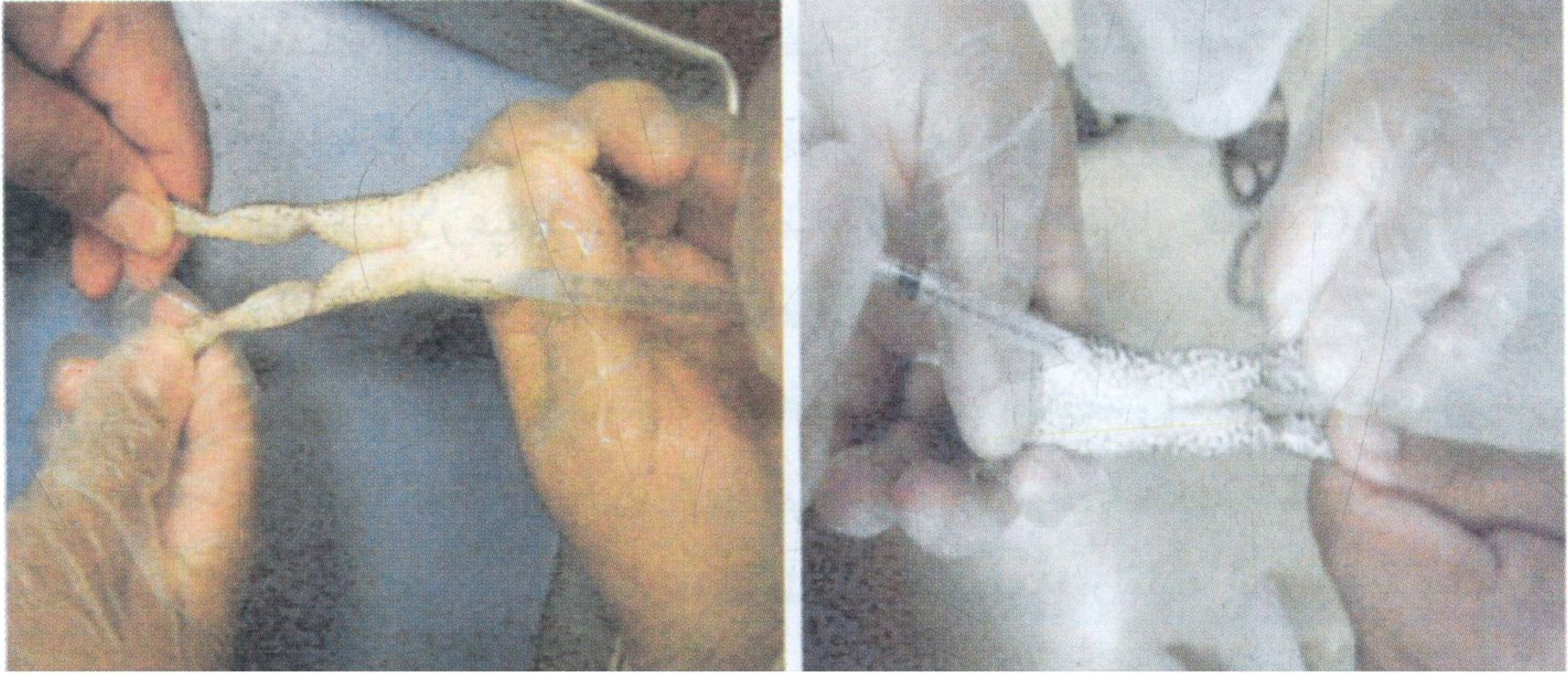
ثانياً: استخراج الغدد النخامية للذكور ومعاملتها

١٠- أعد الخطوات السابقة لأربع ضفادع ذكور كل على حدة حتى نحصل على محلول مستخلص الغدة النخامية من الذكور تحقن الذكور، كما حقنت الإناث من قبل.

١١- ضع الضفادع المحقونة بعد ذلك في وعاء به ماء ارتفاعه ١ بوصة تقريبا، وفي درجة حرارة ٢٥ْم. (لذلك فإننا نستطيع التحكم في وقت التبويض بواسطة درجات الحرارة).



الشكل رقم (٣,١). طريقة استخراج الغدة النخامية في الضفادع.



الشكل رقم (٣,٢). طريقة حقن محلول مستخلص الغدة النخامية في التجويف الجانبي للبطن لتنشيط عملية التبويض في الضفادع.

لقد تبين أن أول كمية من البيض تصل إلى كيس البيض تكون قليلة وغير قابلة للإخصاب (لايمكن إخصابها)، إلا أن نسبة الإخصاب للبيض تزداد إذا ما تجمع البيض كله داخل الرحم قبل عملية التدليك. ويجب اختبار وجود البيض داخل كيس البيض في الأنثى المحقونة خلال ٢٤ ساعة من الحقن، ويتم ذلك كما ذكر سابقا. عند خروج البيض بسهولة ويسر وبأعداد كبيرة فإنه يكون جاهزا لعملية الإخصاب(Fertilization)، ويفضل إجراء هذه الخطوة بعد تحضير معلق الحيوانات المنوية الذي يتم على النحو التالي :

١- استخرج زوجين من الخصي لاثنين من ذكور الضفادع وقطعها بواسطة مقص دقيق ونظيف في طبق بتري يحتوي على ١٠ سم^3 من المحلول الملحي المتساوي التركيز (0.9% Nacl).

٢- اترك معلق الحيوانات المنوية من ٥-١٠ دقائق في درجة حرارة المعمل كي تنتشر وتصبح نشيطة.

خطوات الإخصاب الخارجي في الطبق في الضفادع

١- استخرج بيض الضفدعة بعملية التدليك وضعه مباشرة في طبق بتري نظيف وجاف (معقم)، وتجنب ملامسة البيض للماء في هذه الخطوة، حتي لاتنتفخ الأغشية الجيلاتينية المحيطة به وتمنع عملية الإخصاب.

٢- ضع حوالي ٢٠-٣٠ بيضة في كل طبق بتري على حده.

٣- يضاف لكل مجموعة من البيض ٠,٢ مل من معلق الحيوانات المنوية المركز الذي لابد وأن يمزج جيدا بالبيض ويترك لمدة ٥ دقائق.

٤- أضف ٥-١٠ مل من المحلول الملحي المستخدم في عمل معلق الحيوانات المنوية لكل مجموعة من البيض لكي يغطيها تماما.

٥- بعد ٢٠ دقيقة يضاف لكل طبق ٥-١٠ مل من محلول ملحي جديد حتى يغطي البيض دون أن يملئ الطبق بحيث يُترك فراغ بين الغطاء والطبق لكي يتنفس البيض جيدا أثناء وجوده داخل الطبق. كما يجب الاحتفاظ بالأطباق في مكان به رطوبة نسبية عالية حتى لا يجف.

٦- يظهر الهلال السنجابي بعد حوالي نصف ساعة من عملية الإخصاب عند درجة حرارة ٢٥°م ثم بعد ساعة واحدة وعند الدرجة نفسها يحدث دوران للبيض داخل الأغشية الجيلاتينية بحيث يصبح قطبه الحيواني إلى أعلى وقطبه الخضرى إلى أسفل. وبعد ساعتين ونصف يظهر طور الخليتين (Two-cell stage).

٧- يجب إضافة المحلول الملحي من آن لآخر إلى أطباق بتري، لكي يغطي البيض دائما وذلك لانتفاخ الأغشية الجيلاتينية المحيطة به مما قد يؤدي إلى تمدد كتلة البيض الموجودة داخله.

٨- يجب تحرير الأغشية الجيلاتينية ومحتوياتها من البيض بعد ساعة من الإخصاب لالتصاقها بقاع أطباق بتري.

٩- يسمح للأغشية الجيلاتينية بالانتفاخ والتمدد، حتى تصل إلى الحد الأقصى وحتى يمكن تجزئة البيض إلى مجاميع صغيرة، ويتم ذلك قبل الانقسام الأول وتحتاج كل بيضة إلى ٢ سم^{3} من المحلول الملحي.

الجدول الزمني للنمو الطبيعي لبيض الضفادع[٨]

Schedule of the Normal Development of the Frog's Eggs

من المعروف أن سرعة نمو البيض والأجنة تعتمد على درجة الحرارة المستخدمة أثناء التجربة. والجدول التالي يوضح معدل النمو التقريبي عند كل من درجتي الحرارة ١٨مْ، ٢٥مْ. (انظر الشكل رقم ٣،٣).

المرحلة Stage	معدل النمو عند ١٨مْ (بالساعة)	معدل النمو عند ٢٥مْ (بالساعة)
الإخصاب (Fertilization)	٠،٠	٠،٠
الهلال السنجابي (Grey crescent)	١،٠	٠،٥ - ١،٠
دوران البيض داخل الأغشية (Rotation)	١،٥	١،٠
طور الخليتين (Tow-cell Stage)	٣،٥	٢،٥
طور الخلايا الأربع (Four-cell Stage)	٤،٥	٣،٥
طور الخلايا الثماني (Eight-cell Stage)	٦،٥	٥،٥
طور المفلجة (البلاستيولا Blastula)	١٨،٠	١٢،٠
طور المبطنة (الجاسترولا Gastrula)	٣٤،٠	٢٠،٠
السدادة المحية (Yolk plug)	٤٢،٠	٣٢،٠
الصفيحة العصبية (Neural plate)	٥٠،٠	٤٠،٠
الثنيات العصبية (Neural folds)	٦٢،٠	٤٨،٠
الحركة الهدبية (Cilliary movement)	٦٧،٠	٥٢،٠
الأنبوبة العصبية (Neural tube)	٧٢،٠	٥٦،٠
برعم الذيل (Tail bud)	٨٤،٠	٦٦،٠
الحركة العضلية (Muscular movement)	٩٦،٠	٧٦،٠
ضربات القلب (Heart beat)	٥،٠ أيام	٤،٠ أيام
الدورة الدموية الخيشومية (Gill circulation)	٦،٠ أيام	٥،٠ أيام
الدورة الدموية للزعنفة الذيلية (Tail fin circulation)	٨،٠ أيام	٦،٥ يوما
الخياشيم الداخلية والغطاء الخيشومي (gills&operculum Internal)	٩،٠ أيام	٧،٥ يوما
الغطاء الخيشومي الكامل (Complete operculum)	١٢،٠ أيام	١٠،٠ أيام
التحول (Metamorphosis)	٣ شهور	٢،٥ شهراً

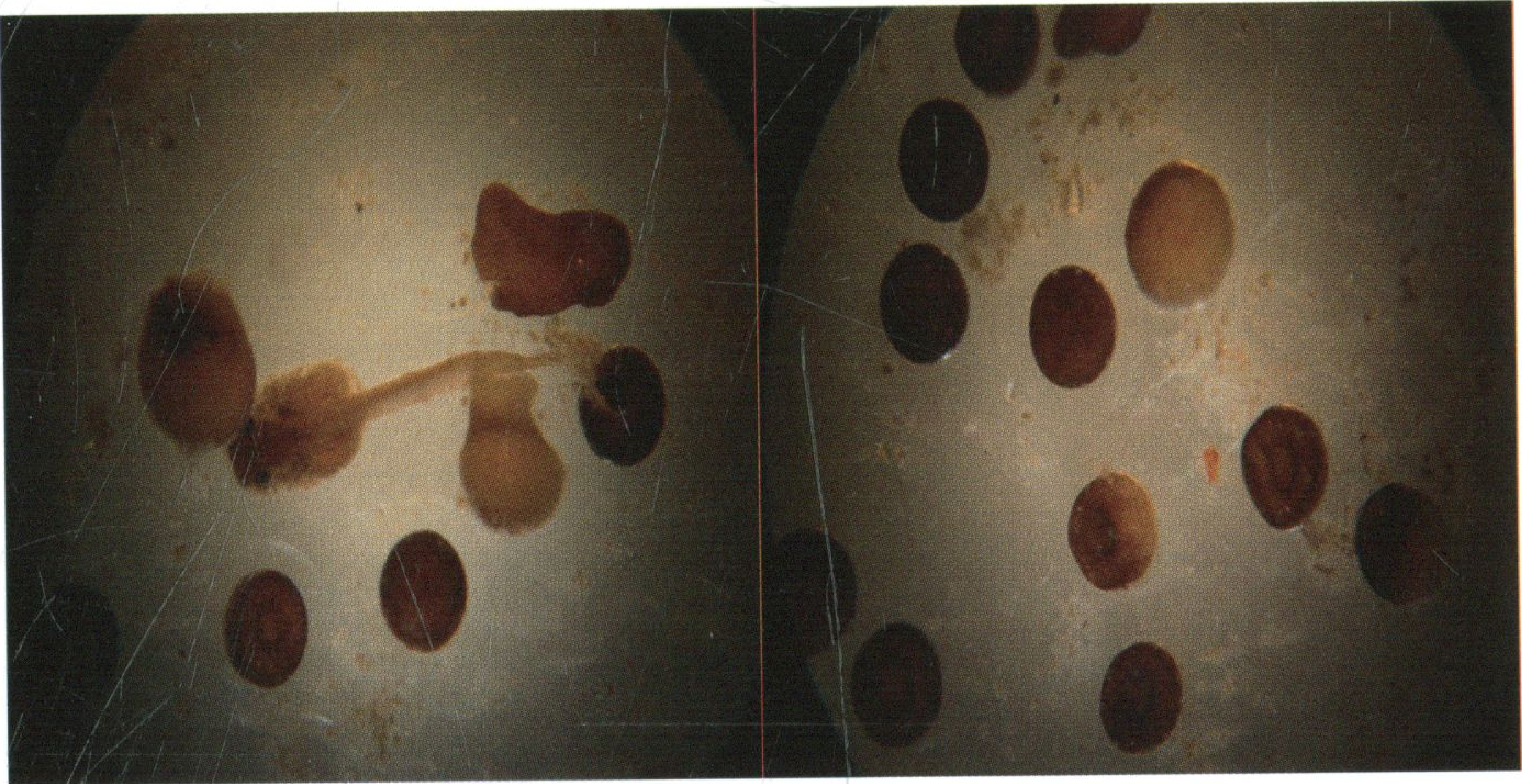
(٨) Rugh (1956).

الشروط الواجب مراعاتها في تجربة الإخصاب الخارجي

١- يجب تغذية الأطوار التي تظهر فيها الخياشيم الخارجية (External gills) ، كما ذكر سابقا في الدراسة العملية الثانية بالخس أو السبانخ المغلية قليلا.

٢- يقلل عدد العينات (أطوار أبو ذنيبة) إلى ٥ يرقات بعد عشرة أيام داخل طبق التربية الذي يحتوي على ٥٠ سم³ من المحلول الملحي.

٣- يجب تغيير المحلول الملحي الموجود داخل أطباق التربية من آن لآخر للتخلص من الفضلات الموجودة ولمنع النمو البكتيري.



الشكل رقم (٣,٣). صور توضح بعض مراحل النمو المختلفة لجنين الضفدعة (١٨×).

تقرير العملي الثالث: تنشيط التبويض في الضفادع باستخدام مستخلص الغدة النخامية

الاسم : .... الرقم : ....

١- كم عدد الضفادع التي شرحت لاستخلاص الغدة النخامية منها؟

الذكور : .... الإناث : ....

٢- ما كمية المحلول الذي وضعت فيه الغدة النخامية؟.. مل.

٣- كم كانت كمية المحلول الذي أعطي لكل أنثى ؟.................... وكم كان عدد الجرعات ....

٤- بعد كم من الوقت خرج البيض من الأنثى؟.. ساعة.

٥- هل كانت كمية البيض أكثر أو أقل من التجربة السابقة ؟.................................

٦- هل تم استخراج الحيوانات المنوية من الذكور؟..

٧- هل كانت الحيوانات المنوية تتحرك ؟..

٨- هل تكونت أجنة من عملية الإخصاب؟...

أ) ما المراحل التي تكونت ؟...

ب) ما درجة حرارة الغرفة الخاصة بالتربية؟...

ج) ما نوع البيئة المستخدمة في التربية؟...

د) أرفق جدولا توضح فيه الساعات بالضبط والعمر الخاص بمراحل نمو الأجنة أثناء متابعتك للتجربة.

٩- إذا لم تكن هناك نتائج ، حدد الأسباب التي أدت إلى عدم الحصول على نتائج.

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الرابع

تجارب على أجنة الضفادع
Experiments on Frog Embryos

الهدف

بعد أن تعلمنا في التجارب السابقة كيف يمكن الحصول على أجنة الضفادع ، فإن هذا الدرس من العملي يهدف إلى التدرب على إجراء بعض التجارب على أجنة البرمائيات.

التجربة الأولى: تأثير العوامل البيئية على نمو الأجنة: التبطين إلى الخارج
(Exogastrulation)

يمكن إجراء عملية التبطين إلى الخارج وهي عكس ما يحدث في الحالة الطبيعية لنمو أجنة البرمائيات، حيث تنغمد الخلايا الخارجية للمفلجة (للبلاستيولا) إلى الداخل بزحفها من خلال ثقب المفلجة إلى الداخل. ولكن في هذه التجربة لا يحدث انغماد للخلايا إلى الداخل، بل تنفصل مجموعة من الخلايا المحملة بالمح (خلايا القطب الخضري) عن خلايا القطب الحيواني، وتتجه للخارج نتيجة لتغير تركيز محلول بيئة تنمية الأجنة، لذلك يمكن إجراء التجربة بتنمية أجنة البرمائيات في طور المفلجة في محاليل عالية أو منخفضة التركيز.

المواد والأدوات المستخدمة في التجربة Materials

- أدوات تشريح دقيقة وطبق تشريح وماصات صغيرة.
- أجنة في طور المفلجة عدد ١٠٠ - ٢٠٠ جنين (يمكن الحصول على الأجنة في طور المفلجة من التجربة السابقة أو يمكن أن تجلب الأجنة من البيئة مباشرة.
- محلول بيئة للتنمية (محلول شتاين بيرت Steinbert's solution).

• أطباق بتري لتنمية الأجنة، مرشحات أو فلتر للتعقيم.

• حضان درجة حرارته ٢٠-٢٥°م.

طريقة إجراء التجربة Method [٩]

تحضير محاليل تنمية الأجنة

١- يحضر لتر واحد من محلول أو بيئة شتاين بيرت الموضح تركيبه في الجدول الآتي:

١- كلوريد الصوديوم ٣,٤ جم (NaCl).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,٠٥ جم (KCl).

٣- كبريتات الماغنيسيوم المائية ٠,٨ جم ($Mgso_4.7H_2O$).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٤ جم ($NaHCO_3$).

٥- حمض الهيدروكلوريك (١) عياري ٤مل (1N HCl).

٦- منظم تريس ٠,٥٦ جم (Tris buffer).

٧- ماء مقطر ١٠٠٠ مل (Distilled water).

يجب أن يكون الأس الهيدروجيني لهذه البيئة ٧,٤ (pH=7.4)، ثم تعقم بواسطة الفلتر.

٢- بعد تحضير المحلول يقسم إلى ١٠ أجزاء كل جزء يحتوي على ١٠٠مل لعمل عدد من التركيزات والتخفيفات المختلفة لبعض هذه الأجزاء مثل :

• أن يضاف ١٠٠ مل ماء مقطر إلى أحد الأجزاء (التخفيف للنصف).

• أو أن يضاف ٢٠٠ مل ماء مقطر إلى أحد الأجزاء (التخفيف للربع).

أو أن تضاف المواد السابقة (في الجدول) إلى كمية أقل من الماء المقطر (٨٠٠ مل مثلا) لزيادة التركيز.

٣- عند وصول الأجنة إلي مرحلة طور المفلجة المبكرة (بعد ١٢- ١٨ ساعة من الإخصاب تقريبا)، تجري عليها التجربة بوضعها في المحاليل السابقة. ولكن قبل ذلك لابد من إزالة الأغشية الجيلاتينية التي تحيط بها وذلك على النحو التالي :

---

(٩) Rugh (1962).

أ) توضع الأجنة في طبق يحتوي على البيئة التي تنمي فيها الأجنة ثم تحت المجهر التشريحي (قوة تكبيره ١٠ وبواسطة ملاقط دقيقة ويفضل أن تكون حادة)، حاول أن تزيل طبقات الأغشية الجيلاتينية الخارجية اللزجة، ولايترك إلا الغشاء الذي يحيط بها مباشرة.

ب) انقل الأجنة بواسطة أنبوبة ماصة إلي محلول بيئي تركيزه مضاعف وحاول أن تمسك الجنين بأحد الملاقط، وبالملقط الآخر أوخز الغشاء الداخلي المحيط بالجنين، ثم اسحبه من حوله، ثم انقل الأجنة إلى محلول آخر متعادل التركيز.

٤- قسم الأجنة إلى مجموعات (لتكن عشرة أجنة) في كل طبق، ثم رقمها وضع في كل طبق تركيزا مختلفا من المحلول، ثم اترك الأجنة لكي تنمو في هذه التركيزات المختلفة داخل الحضان. تابع عملية التبطين إلى الخارج بعد ١٢ ساعة تقريبا من إجراء التجربة، ثم سجل ملاحظاتك عن الأجنة في الأطباق المختلفة التركيزات في نهاية التجربة (الشكل رقم ٤،١) يمكن تثبيت الأجنة في مثبت بوان، ثم الكحول ٧٠٪ وطمرها بالشمع وعمل القطاعات المختلفة لمزيد من الدراسة ورؤية أوضح للأجنة غير السوية أو الطبيعية.

التجربة الثانية : أهمية المنظمات الجنينية
ونقل الشفة الظهرية لثقب المفلجة (البلاستيولا) وزراعتها[١٠]
Embryonic Organizers Importance and Dorsal lip Culture and Transfer

مقدمة

تعتبر عملية نقل الشفة الظهرية لثقب المفلجة (البلاستيولا) وزراعتها من التجارب الأولية التي أجراها العالم شبيمان (Spemann) في مطلع العقد الثالث من هذا القرن والتي من خلالها أمكن معرفة أهمية المنظمات الجنينية (Embryonic organizers) في عملية التمايز الجنيني المبكر وتكوين الأنبوبة العصبية.

الأدوات والمواد المستخدمة Materials

١- أجنة ضفادع في طور المبطنة (الجاسترولة) المبكرة أو المفلجة المتأخرة Early gastrula or late blastula وأجنة في طور المفلجة المبكرة.

---

(١٠) Rugh (1962).

٢- أدوات تشريح (ملاقط ومقصات دقيقة صغيرة حادة ومعقمة).

٣- طبق تشريح صغير بقاعه شمع برافين يحتوي على حفرة صغيرة بحجم الجاسترولا بدون أغشية.

٤- بيئة لزراعة الأجنة (محلول هولتفريتر Holtfreter's solution)، (انظر الدرس العملي الثاني).(أو نصف تركيز محلول شتاين بيرت Steinbert's solution) السابق.

٥- إبرة تنجستن.

٦- ماصات بأحجام صغيرة.

٧- أصباغ حيوية (عند الحاجة مثل الأزرق المثلين أو الأحمر المتعادل).

٨- مجهر تشريحي (قوة تكبيره ×١٠).

طريقة إجراء التجربة Methods

١- توضع الأجنة وهي في طور المبطنة (الجاسترولة) في محلول البيئة في أطباق التشريح.

٢- يتم التخلص من الأغشية الجيلاتينية المحيطة بالأجنة (كما في التجربة السابقة).

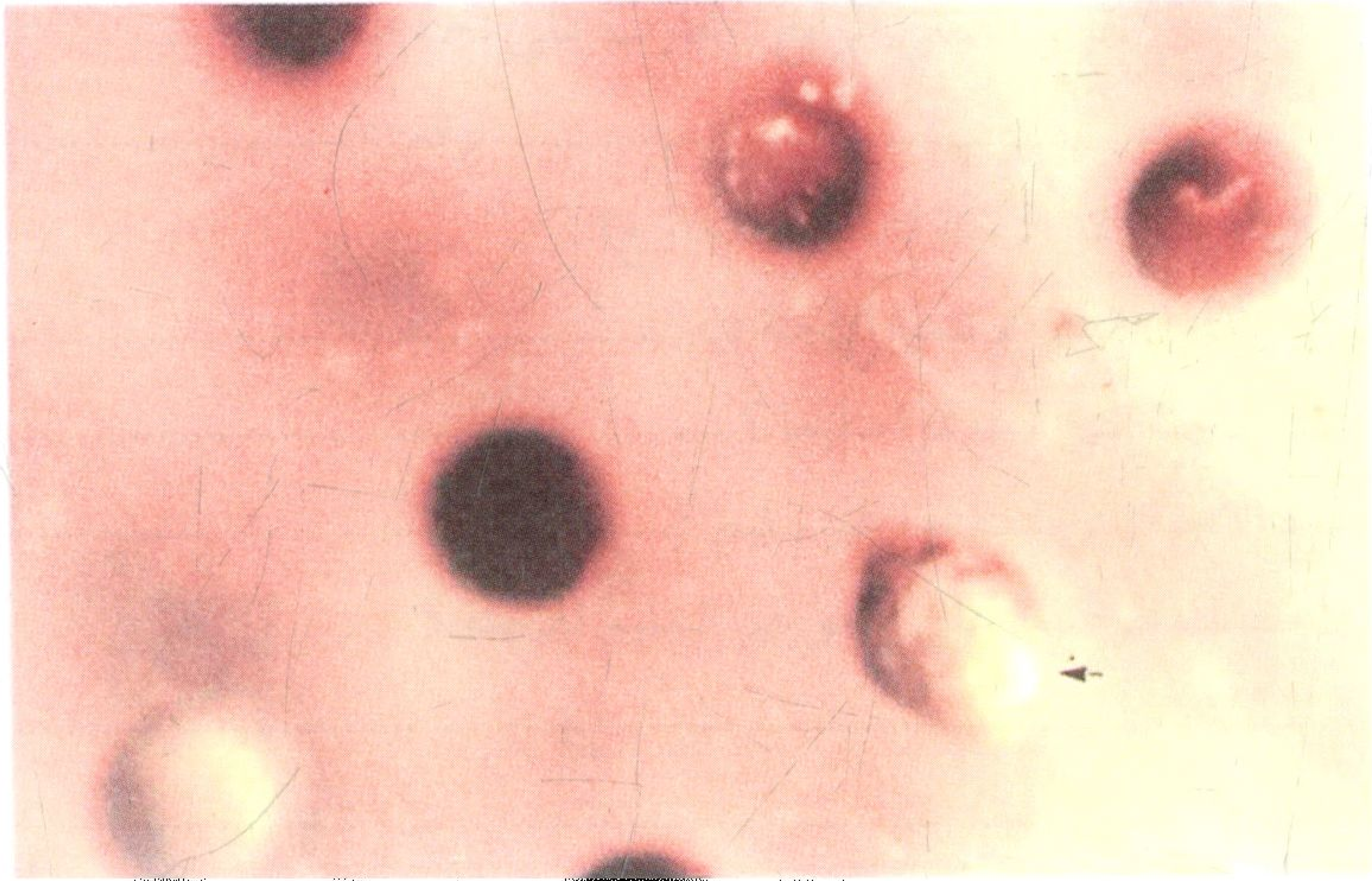
٣- يوضع الجنين المراد نقل الشفة الظهرية منه (الواهب) في إحدى حفر طبق التشريح بحيث يكون ثقب البلاستيولا متجها لأعلى (يتم التخلص من الغشاء المحي إذا لم تستطع الحفاظ علي وضع الجنين) ويوضع الجنين المراد نقل القطعة إليه (المستقبل) في وضع جانبي قريبا من الجنين الواهب.

٤- بواسطة إبرة التنجستن يتم قطع جزء الشفة الظهرية للجنين الواهب (تحت المجهر)، ثم بواسطة الماصة الدقيقة يتم نقل هذا الجزء المقطوع (الشفة الظهرية) وإدخاله إلي تجويف المعي الأولي في حالة البطينة (الجاسترولا) أو في تجويف المفلجة للجنين المستقبل كما في الشكل رقم (٤.٢).

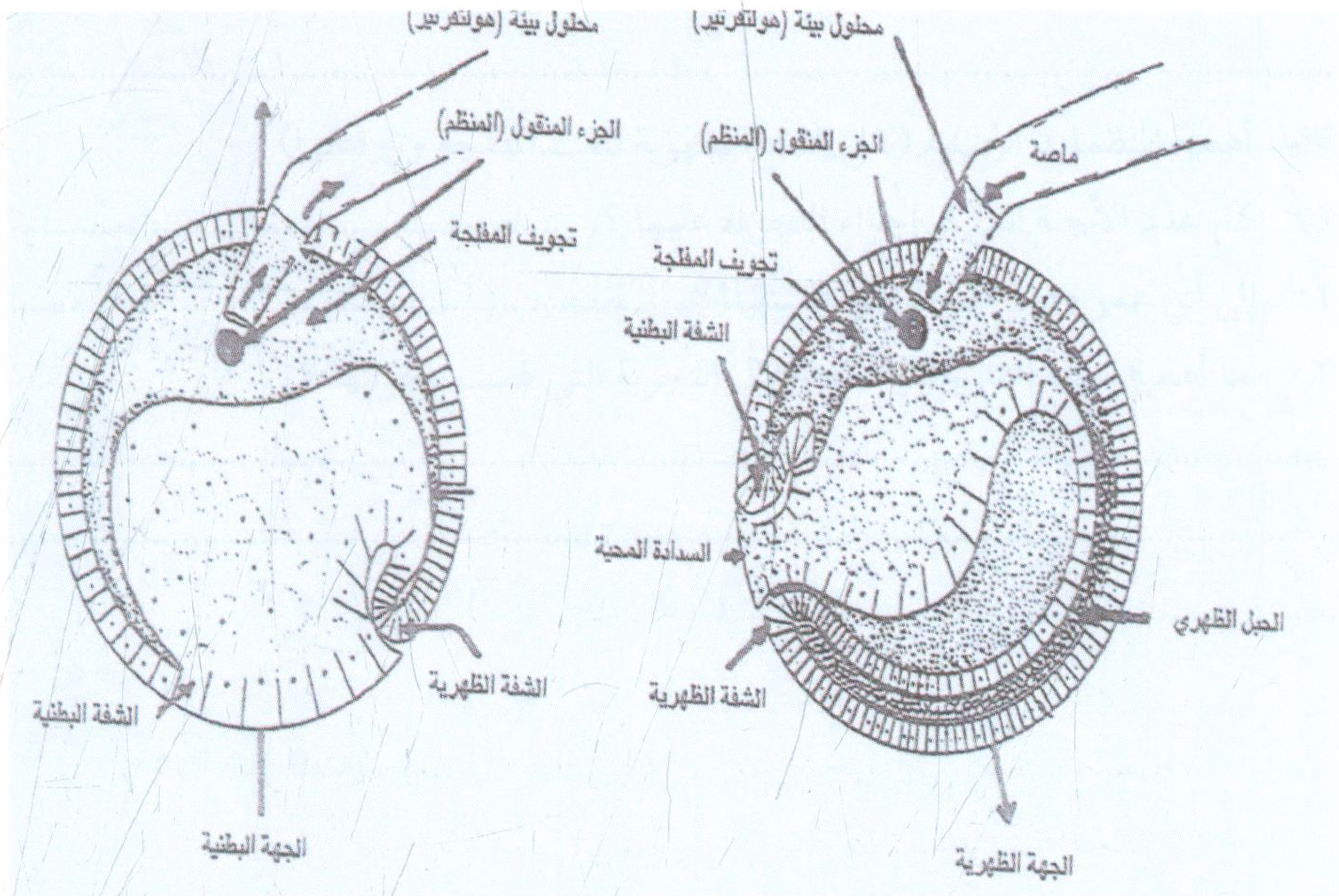
٥- انقل الأجنة بعد ساعة تقريبا من إجراء التجربة إلي البيئة لتنميتها.

٦- تابع مراحل النمو على فترات وسجل ملاحظاتك عن نمو الأجنة.

٧- يمكن بعد ٢٤ ساعة من إجراء التجربة عمل بعض القطاعات لبعض الأجنة التي أجريت عليها التجربة، وذلك بوضعها في مثبت بوان، ثم طمرها في الشمع وتقطيعها وتحميلها على الشرائح الزجاجية، ثم صبغها بالهيماتوكسلين والإيوسين.



الشكل رقم (٤,١). صورة توضح عملية التبطين الخارجي (Exogastrulation) لأجنة الضفدعة نتيجة لوضعها في محلول قليل التركيز (مشار إليه بالسهم التكبير ×15) (عن الحميدي وآخرون ١٤١٨هـ).



الشكل رقم (٤,٢). رسم توضيحي لطريقة نقل أجزاء من جنين ضفدعة الشفة الظهرية إلى آخر في طور المفلجة (البلاستيولا المتأخرة وزراعتها [عن : Rugh,1964].

تقرير العملي الرابع : تجارب على أجنة الضفادع

الاسم : .... الرقم : ....

أولا : تأثير البيئة على نمو الأجنة (التبطين للخارج).

١- ما تركيز المحلول الذي تم تنمية الأجنة فيه؟..

٢- كم عدد الأجنة التي نمت نموا سليما ؟..

٣- كم عدد الأجنة التي نمت نموا غير سليم ؟..

٤- ما ملاحظاتك الوصفية على النمو غير السليم للأجنة ؟

....

....

٥- ما أهمية هذه التجربة من حيث علاقتها بالبيئة ونمو الأجنة ؟(اكتب بشكل مختصر)

....

....

....

ثانيا: أهمية المنظمات الجنينية (نقل الشفة الظهرية لثقب المفلجة وزراعتها)

١- كم عدد الأجنة التي تم إجراء التجربة عليها ؟..

٢- إلى أي عمر وصل نمو الأجنة المستقبلة؟..

٣- ما أهمية المنظمات الجنينية من خلال التجربة التي قمت بإجرائها ؟

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الخامس

تجدد الزعنفة الذيلية لطور أبي ذنيبة (البرمائيات)
Regenration of Tadpole Tail Fin (Amphibian)

الهدف

في هذا الدرس العملي سوف نتابع عملية التجدد (Regeneration) التي تحدث في بعض الكائنات الحية وخاصة البرمائيات والزواحف، حيث يحصل إزالة أو فقد للتمايز الخلوي في منطقة البتر، ثم تكون بلاستيما التجدد، ثم إعادة التمايز. حيث سنقوم بقطع جزء من الزعنفة الذيلية لطور أبي ذنيبة للضفدعة ثم نتابع عملية نموه.

تجدد الزعنفة الذيلية في الطور اليرقي لأبي ذنيبة

المواد والأدوات المستخدمة Materials

- أدوات تشريح (ملاقط، ومقصات).
- أحواض صغيرة لتربية يرقات أبي ذنيبة.
- عدد عشر يرقات من طور أبي ذنيبة.
- أطباق بتري.
- مادة الكلوريتون المخدرة (Chloretone) أو (Tricaine methane sulfonate).

طريقة عمل التجربة Method:

١- حضر كمية من المادة المخدرة (ليرقات أبي ذنيبة) وذلك بإذابة كمية من المادة المخدرة (Tricaine methane sulfonate). في محلول بيئة ١٠٪ هولتفريتر (Holtfreter's) بحيث يصبح التركيز ١ : ١٢,٠٠٠ أو إذابة مادة الكلوروتون (Chloretone) بنسبة ١ : ٣٠٠٠ ماء.

٢- ضع يرقات أبي ذنيبة في طبق بتري يحتوي على كمية من محلول المادة المخدرة حتى تتوقف اليرقات عن الحركة (لمدة ٥- ١٠ دقائق).

٣- أخرج اليرقات مباشرة من محلول المادة المخدرة وضعها في محلول بيئة ١٠٪ هو لتفريتر وسجل أطوال الذيل فيها قبل القطع.

٤- اقطع بواسطة المقص أجزاء معينة من ذيل يرقة أبو ذنيبة. (وليكن طول ومستوى القطع يختلف من يرقة لأخرى). كأن يكون أحدهما موازيا لمحور الذيل والثاني عرضيا عليه والثالث قريبا من طرف الذيل والرابع أبعد (الشكل رقم ٥,١).

٥- ضع اليرقات في ماء بركة لتنميتها ومتابعتها فيما بعد.

٦- سجل ملاحظاتك عن تكوُّن بلاستيما التجدد والتئام مكان القطع وطول الذيل.

ويمكن تتبع عملية النمو ومراحل التجدد بعد عملية البتر (Amputation) بعمل قطاعات نسيجية طولية مصبوغة لمنطقة البتر من الذيل في مراحل مختلفة من عملية التجدد للزعنفة الذيلة (Regenerating tail fin) ومتابعة مراحل التجدد التالية :

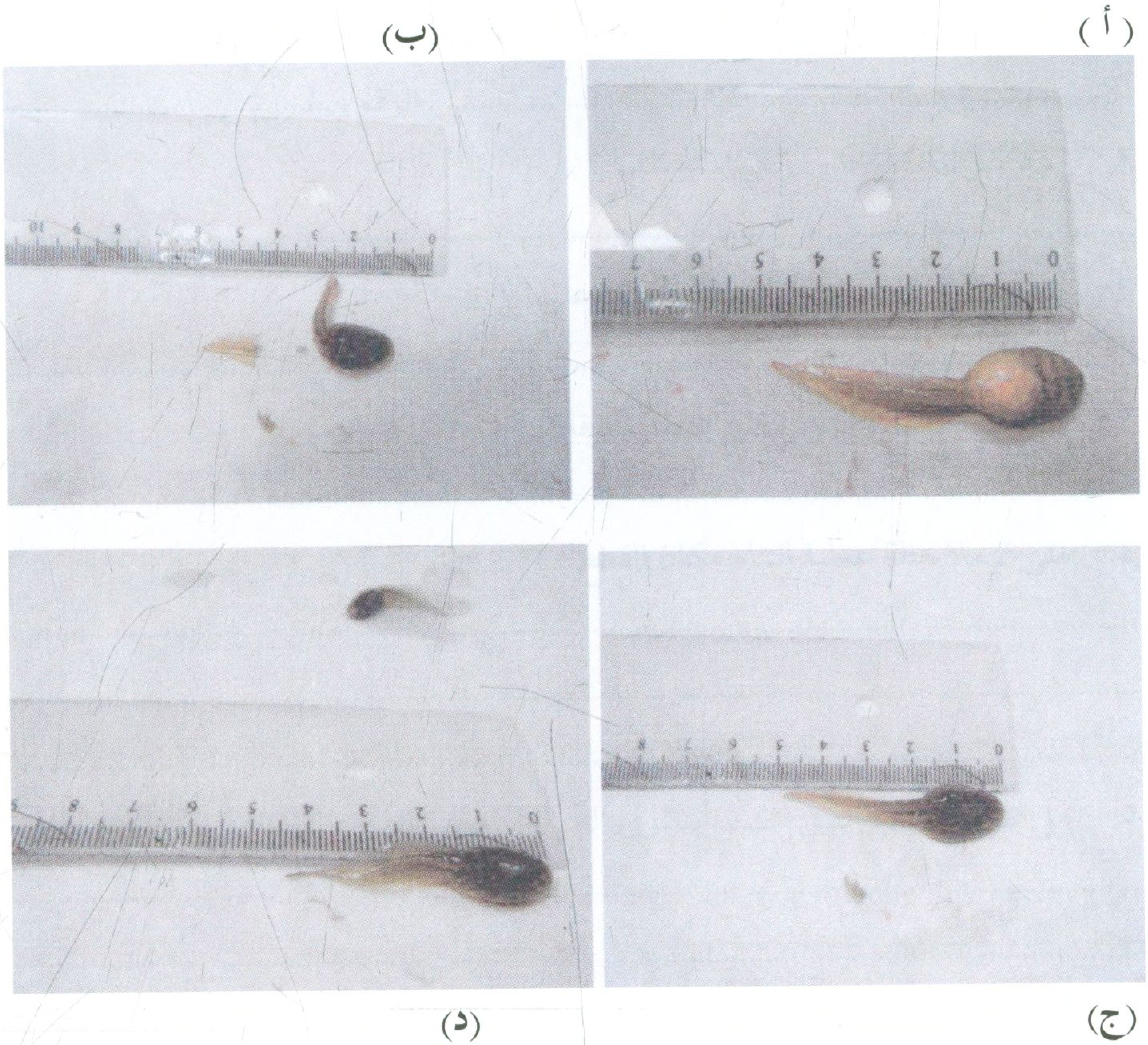
١- مرحلة البتر (Amputation stage).

٢- مرحلة الإلتئام الجرح (Wound healing stage).

٣- مرحلة فقد التميز الخلوي (Dedifferentiation stage).

٤- مرحلة تكوين البلاستيما (Blastema formation stage).

٥- مرحلة إعادة التميز (Redifferentiation stage).



الشكل رقم (٥,١). صورة لطور أبي ذينيبة قبل القطع (أ) وبعد القطع (ب) ثم بعد التجدد (ج،د).

تقرير العملي الخامس: تجدد الزعنفة الذيلية لطور أبي ذنيبة

الاسم : .... الرقم : ....

١- ما تركيز المادة المخدرة التي استعملتها ؟

....

٢- كم عدد اليرقات التي تم إجراء التجربة عليها ؟

....

٣- كم طول الزعنفة الذيلية قبل القطع لليرقات ؟

....

٤- متى تم ملاحظة عملية التئام مكان القطع؟

....

....

....

٥- هل طول التجدد الذي حصل يساوي الطول الأصلي للذيل المقطوع ؟

....

....

٦- ما المدة التي تمت فيها عملية التجدد ؟

....

٧- ماذا تعلمت من هذه التجربة ؟

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

القسم الثاني

تجارب علمية على جنين الدجاج (الطيور)

Expermint on Chick Embryos (Aves)

العملي السادس

عمل النافذة والغطاء القشري في بيضة الدجاج
Making Window and Egg Shell Cover of Chick Embryo

الهدف

يعتبر جنين الدجاج من أكثر الأجنة التي أجريت عليها التجارب المعملية سواءً لمتابعة النمو أو لدراسة تأثير المواد الكيميائية، وذلك لكبر حجم البيض وسهولة الحصول عليه وتنميته. سوف نتطرق في التجارب التالية إلى طريقة متابعة نمو جنين الدجاجة، طريقة عمل تحميل، ثم زراعة الجنين خارج البيضة وتنميته. وسوف نذكر قبل ذلك بعض العوامل التي يجب مراعاتها عند التعامل مع أجنة الطيور من حيث:

درجة الحرارة = ٣٨ مْ، الرطوبة النسبية = ٦٠٪، التهوية = ثاني أكسيد الكربون ١٪، أكسيجين ٢٠٪.

أولاً: العوامل الرئيسية لحفظ بيض الطيور (الدجاج) في المعمل وتنميته

١ – حفظ البيض

تتأثر عملية نمو جنين الدجاجة ووصوله إلى مرحلة الفقس بدرجة الحرارة والرطوبة النسبية التي يحفظ فيها البيض قبل التحضين.

درجة الحرارة المناسبة لحفظ البيض تتراوح مابين ٧–١٥ ْم، هذا ويمكن حفظه في حالة جيدة لمدة أسبوعين.

يجب أن يؤخذ في الاعتبار أن عدم الحرص الشديد في تحريك البيض في أثناء نقله قد يقلل من فرصة نجاح نمو الأجنة.

٢- التحضين

أ) درجة الحرارة

يعتبر عامل الحرارة من العوامل الرئيسية لعميلة تحضين ونمو الأجنة، وتعتبر درجة الحرارة ٣٨°م هي الدرجة المناسبة، وقد تتراوح ما بين ٣٦-٣٩°م، ويمكن للأجنة أن تبدأ عملية النمو بدرجات أقل من ذلك، ولكن فرصة إكمالها أو وصولها لمراحل الفقس تقل بشكل كبير. ومما تجدر الإشارة إليه أنه إذا بدأت عملية التحضين فإنه يجب الاستمرار فيها وأن أي توقف بعد ذلك يمكن أن يؤدي إلى موت الأجنة، هذا ويمكن إيقاف عملية التحضين لمدة لا تزيد عن ٢٤ ساعة عند درجة حرارة لا تقل عن ٢٥°م، وذلك خلال الأسبوع الأول من التحضين إذ أن الأجنة الأكبر من ذلك تكون أقل مقاومة للانخفاض في درجة الحرارة.

ب) الرطوبة النسبية

تعتبر الرطوبة النسبية في أثناء تحضين البيض ثاني أهم العوامل في عملية التكوين الجنيني في الطيور، إذ تقل فرصة الفقس بزيادة أو قلة الرطوبة النسبية. معدل الرطوبة النسبية المناسبة هو ٦٠٪ عند ٣٨°م، ويمكن زيادة ذلك المعدل بزيادة عمر الجنين بحيث لا تتعدى ٧٠٪.

جـ) التهوية

المقصود بالتهوية هو الاتزان بين نسبتي كل من ثاني أكسيد الكربون والأكسيجين، ويراعى ألا تزيد نسبة ثاني أكسيد الكربون عن ١٪، إذ إن الزيادة عن ذلك تبطئ بعملية نمو الأجنة داخل البيض، كما تقدر نسبة كمية الأكسيجين ما بين ٢٠-٣٠٪ ويفضل أن يكون الحضان مزوداً بمروحة شفط صغيرة تعمل على تجديد التهوية حول البيض. يلاحظ أن الأجنة في المراحل الأولى من النمو لا تحتاج إلى تهوية أو رطوبة بشكل كبير.

د) التحريك أو تقليب البيض

يعتبر عامل التحريك من العوامل المهمة في زيادة نسبة معدل الفقس للبيض المحضن وذلك لمنع التصاق الأجنة بالقشرة الكلسية من الداخل.

التحريك المناسب هو مرة أو مرتين في اليوم الواحد، ويفضل البدء فيه في اليوم الثاني من التحضين حتى اليوم ١٨.

ثانياً: الطرق المتبعة لمشاهدة تطور (نمو) جنين الدجاج[١١]

يتم إخصاب بيض الدجاج في الطرف العلوي من قناة البيض، وبمرور الوقت تضع الدجاجة بيضها الذي يحتوي بداخله على جنين في طور التبطين المبكر والقرص الجرثومي. إن هذا البيض في ذلك الوقت لايبدي أي مشاهدات تركيبية، ولكن بعد ١٨ ساعة من التحضين ربما يشاهد الخط البدائي.ويتم فحص البيض بوضعه بين العين ومصدر الإضاءة (Candling)، (ومن المعروف أن مرور ٣٣ ساعة من بدء التحضين لا يسهل ملاحظة أي نمو داخل البيض المحضن).

وهناك طريقتان لمتابعة نمو جنين الدجاج داخل البيض

أ) طريقة عمل نافذة أو فتحة في البيضة The window method

الأدوات والمواد المستخدمة:

- شمع برافين وبيض مخصب.
- حضان درجة حرارته تتراوح ما بين ٣٧-٣٩ مْ ونسبة رطوبته ٦٠٪.
- حلقات زجاجية (بقطر ١,٥-٢سم) أغطية شرائح زجاجية مربعة صغيرة (بقطر ٢-٢,٥ سم). ومنشار صغير لعمل فتحة بالبيض.
- أدوات تشريح: مقص صغير/ مشرط /ملاقط (معقمة) / إبر تشريح أنشوطة شعرية/ فرشاة رسم.
- موقد بنزن (للتعقيم ورفع درجة حرارة مكان التجربة).
- صندوق فحص البيض المزود بمصدر إضاءة داخلية وفي قمته فتحة أقل من حجم البيضة.
- كمام طبي للأنف والفم، وورق مسحة كحول / أو كحول ٧٠٪ للتعقيم.

طريقة إجراء التجربة (الشكل رقم ٦,١)

١- عقم المكان الذي سوف تُجرى عليه التجربة وذلك بمسحة بقطعة من القطن المبلل بالكحول ٧٠٪ (أو الديتول المخفف جدا).

٢- أوقد اللهب بالقرب من المكان (لرفع درجة حرارة المكان، وكذلك للمساعدة في عملية التعقيم).

---

(١١) الحميدي وآخرون ١٤٣٢هـ، الحميدي وآخرون ١٤١٨هـ.

٣- تأكد من أن الطور الجنيني داخل البيض أقل من ٣٣ ساعة (من بدء التحضين)، ثم ضع البيضة علي قطعة من القطن بحيث يكون طرفها المدبب على يمينك، حرك طرفها المدبب إلى أسفل محورها الطولي تدريجيا، فيتحرك القرص الجرثومي بداخلها تجاه طرفها العريض المقابل للحيز الهوائي (Air space)

٤- اترك البيضة في هذا الوضع لعدة دقائق.

٥- أمسك البيضة وهي على وضعها السابق، ثم افحصها بين العين ومصدر الإضاءة (صندوق الفحص Candling box)، لتحديد مكان القرص الجرثومي، ثم ضع علامة بالقلم المرسام على قشرة البيضة المقابلة له.

٦- أعد البيضة مرة أخرى على قطعة القطن في وضعها السابق نفسه.

٧- بواسطة ملقط (سبق غليه في الماء لتعقيمه)، خذ قطعة من القطن ثم اغمسها في ٧٠٪ كحول مضاف إليه ١٪ يود (مذاب في يوديد البوتاسيوم)، ثم امسح القشرة الكلسية للبيضة شاملا المنطقة التي يوجد تحتها القرص الجرثومي، ثم جفف القشرة بقطعة من القطن المعقم.

٨- خذ حلقة (معقمة بالكحول) مصنوعة من الزجاج قطرها لايزيد على ٢ سم، ثم ضعها على قشرة البيضة فوق منطقة القرص الجرثومي. اخدش قشرة البيضة بواسطة إبرة تشريح معقمة على طول الحافة الداخلية للحلقة الزجاجية، ثم ضع الحلقة الزجاجية بعد ذلك في ٧٠٪ كحول.

٩- بواسطة المنشار حاول أن تقص مكان الحلقة الذي حددت وذلك بشكل خفيف أو اخدش قشرة البيضة بواسطة إبرة تشريح معقمة على طول الحافة الداخلية للحلقة الزجاجية ثم بواسطة المقص الدقيق المدبب قص الدائرة دون المساس بالأغشية أسفل منها، احرص على أن لا تثقب الغشاء القشري الرقيق أسفل القشرة الكلسية.

١٠- أزل فتات القشرة الكلسية الناتج عن الخدش بواسطة الملقط تأكد دائما من أن أدوات التشريح معقمة، والأيدي نظيفة، وأن تلبس كمام يغطي الأنف والفم عندما تكون البيضة مفتوحة ولا تسمح بدخول الغبار إليها، وذلك بعمل التجربة تحت دولاب التعقيم (Hood).

١١- ارفع الحلقة الزجاجية من الكحول واتركها تجف في الهواء، ثم اغمسها في شمع برافين درجة انصهاره ٤٥ْم وانقلها بعد ذلك إلى البيضة بحيث تحيط بالفتحة الموجودة بها، مع تجنب دخول الشمع إليها. ثم بواسطة فرشاة صغيرة خذ من الشمع المصهور إلى الحواف الخارجية للحلقة الزجاجية لمنع دخول الهواء أسفل منها.

١٢- قبل التخلص من الأغشية الداخلية والخارجية لقشرة البيضة، يجب أن تتأكد من أنه لايوجد عليها فتات من القشرة الكلسية ثم بعد ذلك رطب الأغشية بقطرات من محلول لوك الفسيولوجي أو من المحلول الملحي المتعادل (٠,٩٪ كلوريد الصوديوم). عقم أدوات التشريح مرة أخرى باللهب وكذلك حواف القشرة الكلسية (بالكحول). ثم بواسطة إبرة تشريح معقمة اعمل ثقبا في الجزء الجانبي من أغشية البيضة، ثم بالاستعانة بمقص حاد ومعقم، قص الأغشية موازيا لفتحة القشرة وأزلها بحرص شديد مستخدما في ذلك ملقطا دقيقا ومعقما.

١٣- خذ غطاء الشريحة الزجاجية ونظفه وامسكه بالملقط ومرر وجهي الغطاء على لهب بنزن، ثم ثبته بعد ذلك فوق الحلقة الزجاجية الموجودة على البيضة، ثم بواسطة فرشاة، انقل شمع البرافين المصهور إلى الحواف الخارجية للغطاء حتى يلتصق تماما بالحلقة.

١٤- أعد البيضة إلى الحضان بنفس وضعها السابق، وبعد ٢٤ ساعة قلب البيضة داخل الحضان، بحيث يكون الجنين والأغشية المحيطة به بعيدا عن الفتحة.

١٥- افحص البيض تحت المجهر التشريحي أو عدسة مكبرة متى ما شئت لمتابعة نمو الجنين.



الشكل رقم (٦,١). صورة بيضة تم عمل نافذة زجاجية على قشرتها الكلسية لمتابعة نمو وإجراء التجارب على جنين الطيور (حلقة زجاجية + غطاء شريحة + ورق مسحة كحول).

ب) طريقة عمل الغطاء القشري[١٢] The shell cap method

تتلخص طريقة عمل الغطاء القشري في إزالة القشرة الكلسية للطرف العريض من البيضة لتغطية الطرف العريض المعرى لبيضة أخرى. ويجب أن يزال الغطاء دوريا لمشاهدة نمو الجنين داخل البيضة من خلال فتحة أكبر من الفتحة التي ذكرت في الطريقة الأولى (النافذة)؛ إلا أن لهذه الطريقة عيوبا يمكن إيجازها في الآتي:

- رفع الغطاء دوريا قد يعرض البيضة للتلوث البكتيري.
- عدم انتقال غازات التنفس من خلال الغطاء قد يعرض الجنين للاختناق.
- يجب في هذه الطريقة توفير نصف قشرة البيضة العريض من البيض غير المحضن

طريقة إجراء التجربه (الشكل رقم ٦،٢)

١- حدد الحيز الهوائي في الجزء العريض من البيضة، ثم ضعها في مكان بحيث يكون الطرف العريض إلى أعلى، ثم نظف الجزء العريض بقطعة من القطن المبلل بالكحول (٧٠٪) المضاف إليه اليود، ثم جفف المكان نفسه بقطعة أخرى من القطن المعقم.

٢- بواسطة إبرة تشريح أو ملقط معقم، اعمل ثقبا في وسط الجزء العريض من البيضة، ثم وسع الثقب تدريجيا بإزالة القشرة الكلسية في هذه المنطقة.

٣- اترك أغشية نصف القشرة في مكانها، وعقمها بالكحول المضاف إليه اليود، اجعل حافة القطع بالغطاء القشري (Shell cap) المستخدم ناعمة وذلك بغمسها في البرافين المصهور.

٤- ضع غطاء القشرة المعقم بالكحول واليود على الجنين المعرى في الطرف العريض من البيضة، ثم ضع البيضة في حضان بحيث يكون هذا الطرف العريض للأعلى والطرف المدبب إلى أسفل، يجب رفع نسبة الرطوبة عن ٦٠٪ لهذا البيض، لأن مساحة السطح المعرى للجنين كبيرة، وذلك لتفادي البخر الذي يحدث نتيجة لذلك.

٥- في اليوم السابع عشر من بدء التحضين، يرش الماء المعقم على قشرة البيضة مرتين يوميا.

---

(١٢) Harrison (1977).

مكونات محلول لوك الفسيولوجي Locke's solution:

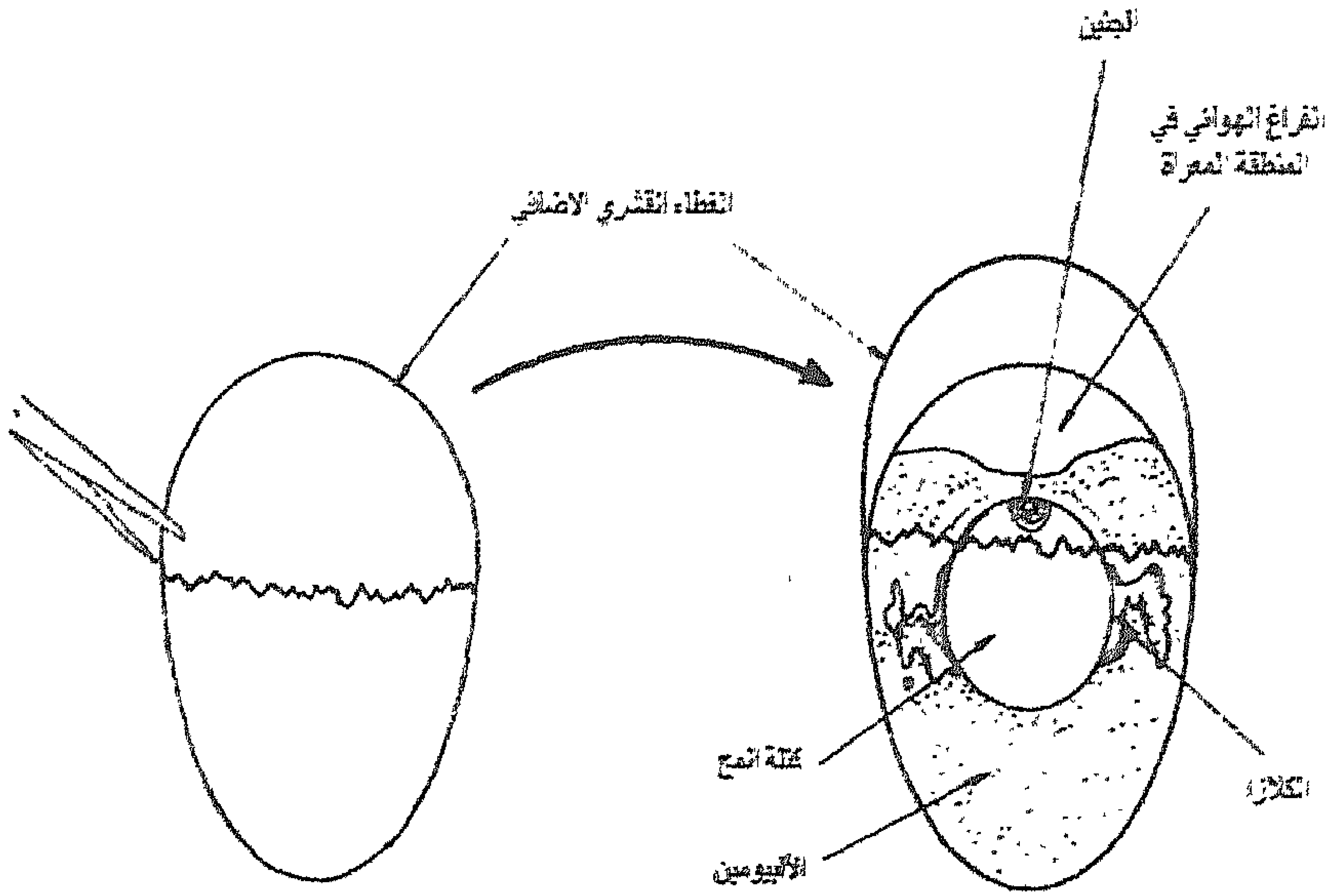
١- كلوريد الصوديوم ٠,٢٤ (NaCl 0.24g).

٢- كلوريد البوتاسيوم ٠,٠٤ جم (KCl 0.04g).

٣- كلوريد الكالسيوم الجاف ٠,٢٤ جم ($CaCl_2$ 0.02g).

٤- بيكربونات الصوديوم ٠,٠٢ جم ($NaHCO_3$ 0.02g).

٥- ماء مقطر ١٠٠٠ مل (Distilled water 1000ml).



الشكل رقم (٦,٢). رسم توضيحي لطريقة عمل الغطاء القشري لبيضة دجاجة تم إزالة جزء من قشرتها الكلسية.

تقرير العملي السادس: عمل نافذة والغطاء القشري في بيضة الدجاج

الاسم : .... الرقم : ....

١- سجل درجة حرارة الحضان : .... درجة الرطوبة النسبية : ....

٢- كم كان عمر الجنين تقريبا أثناء عمل النافذة؟.. ساعة.

٣- كم بيضة عملت فيها نافذة ؟ العدد : ....بيضة.

٤- كم كان مجموع البيض الذي عمل فيه نافذة ؟عدد : ....

٥- كم جنينا بقي حيا ولم يتلوث ؟ العدد : ....

٦- كم كان عدد الأجنة التي واصلت الحياة إلى طور الفقس؟ : العدد : ....

٧- سجل بعض ملاحظاتك حول الأجنة التي تم عمل نافذة فيها ولم تكمل نموها، ثم عدد الأسباب التي تتوقعها والتي أدت إلى عدم نمو الأجنة.

....

....

٨- كم كان عدد البيض الذي عملت له أغطية ؟ العدد : ....

٩- كم كان عدد الأجنة التي واصلت النمو بعد ٢٤ ساعة من عمل الغطاء؟..................

١٠- سجل ملاحظاتك حول نمو الأجنة خلال متابعتك لها، وكذلك دون ملاحظاتك عن الأسباب التي أدت إلي عدم نمو الأجنة الأخرى:

....

....

١١- أيهما أفضل من حيث النتائج التي تم الحصول عليها طريقة عمل النافذة أم الغطاء؟

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي السابع

تأثير بعض المواد على التكوين الجنيني للدجاج

Effect of Some Materials on the Chick Embryo Development

تجربة تأثير بعض العوامل على نمو أجنة الدجاج

الهدف

إن طريقة النافذة في قشرة بيض الدجاج تجعل من الأجنة مادة مناسبة لدراسة تأثير العوامل المؤدية إلى التشوهات الجنينية (Teratogenic agents) مثل: المضادات الحيوية وموانع (مضادات) التمثيل الغذائي (Antimetabolites) والأشعة السينية أو أشعة إكس (X-rays) وغيرها (١٣). لمعرفة متى وكيف تؤثر مثل هذه العوامل على الأجنة من خلال تجربتها على الأجنة قبل التحضين أو بعد التحضين بساعات (مرحلة الخط البدائي حتى ١٨ساعة تحضين) (قبل التمايز الخلوي للأجنة) أو بعد ٢٤ساعة تحضين أوبعد ٣٣ساعة تحضين (بداية تكوين الأعضاء) أو غير ذلك بعد ٧٢ساعة أو أكثر (بعد التمايز للأعضاء) لدراسة تأثير هذه العقاقير أو المواد مثل عوامل النمو على التكوين الجنيني.

يمكن عمل تجربة تأثير المواد على أجنة الطيور باتباع الخطوات التالية:

١- يتم تجهيز مجموعات من البيض المخصب (قبل التحضين ١٠ أو بعد التحضين بساعات ١٨ ساعة أو بعد التحضين ٢٤ ساعة فأكثر كل مجموعة تتكون على الأقل ١٥ بيضة ويوزن البيض لتحديد كمية الجرعة المطلوب حقنها.

---

(١٣) كريم (١٤١١هـ).

٢- ثم يتم عمل نافذة له كما في الدرس العملي السابق.

٣- يجهز تركيز العقار مثل المضاد الحيوي الأموكسيل (Amoxcil) ٥٠٠ ميكروجرام /كجم (٠,٥ لكل جرام).

٤- يحقن البيض بالجرعة المناسبة لوزن البيضة مثلا ١ ميكو جرام / جرام.

$$\text{تحديد الكمية المطلوبة للحقن} = \frac{\text{وزن البيضة (١٠٠جرام)×تركيز المادة(٠,٥)}}{\text{الجرعة المرغوبة (١ ميكرو/جرام)}}$$

٥- يتم متابعة البيض بعد الحقن خلال فترة التحضين وتسجيل الملاحظات التي تطرأ على الأجنة نتيجة الحقن بالمادة. حسب الجدول رقم (٧,١).

الجدول رقم (٧,١) يوضح نتائج تجربة تأثير المواد على عمل التشوهات في أجنة الدجاج.

عدد البيض المحقون	عمر الأجنة	اسم المادة المحقونة	كمية الجرعة المحقونة	عدد الأجنة المشوهة٪	نوع التشوهات

تقرير العملي السابع:
تأثير بعض المواد على التكوين الجنيني للطيور

اسم الطالب : .... الرقم الجامعي : ....

١- ما المادة المحقونة المستخدمة في التجربة؟...

٢- كم عدد البيض الذي تم حقنه؟...

٣- ما التركيز الذي تم حقنه في البيض؟..

٤- كم عدد الأجنة التي نمت؟............... والأجنة التي توقفت عن النمو؟.............

٥- كم عدد أو نسبة الأجنة المشوهة؟...٪

٥- ما التشوهات التي حدثت للأجنة؟...

....

أرفق صورة للأجنة المشوهة:

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الثامن

زراعة القرص الجرثومي لجنين الدجاج
Germ Disc Culture of Chick Embryo[١٤]

الهدف

تتلخص هذه الطريقة في فصل الغشاء المحي (Vitelline membrane) الحامل للجنين عن المح، ثم وضعه في وعاء مناسب للزراعة بحيث يلامس مادة الألبيومين التي يتم وضعها أسفل منه داخل الوعاء. أما القرص الجرثومي الموجود في الجهة العلوية للغشاء المحي، فيكون مطمورا في مادة الزراعة نفسها. تؤخذ الأجنة المزروعة عادة من البيض الذي يكون قد تم تحضينه من قبل لمدة ٢٢-٢٤ ساعة والتي يكون ظهر فيها الخط البدائي (Primitive streak) وثنية الرأس (Head fold) أو القطع العضلية أقل من أربعة أزواج. قبل إجراء هذه التجربة يجب تعقيم أدوات التشريح ومحلول الزراعة الذي يتكون من محلول بانت كومبتون الملحي + الجلكوز(Pannet-compton saline solution plus glucose)، ويتكون هذا المحلول من المحلولين أ، ب.

أ) المحلول الأول Stock solution A يحضر مركز هذا المحلول من الآتي:

١- كلوريد الصوديوم ٩٦,٨ جم (NaCl).

٢- كلوريد البوتاسيوم ١٢,٤ جم (KCl).

---

(١٤) New (1964).

٣- كلوريد الكالسيوم المائي ١٦,٧ جم ($CaCl_2.2H_2O$).

٤- كلوريد الماغنسيوم المائي ١٠,٢ جم ($MgCl_2 6H_2O$).

٥- ماء مقطر ٨٠٠ مل (Distilled water).

ب) المحلول الثاني Stock solution B ويحضر مركز هذا المحلول من الآتي:

١- فوسفات الصوديوم المائية ٢,٤ جم ($NaH_2PO_4.2H_2O$).

٢- فوسفات الصوديوم المائية الثنائية ٥,٦١ جم ($Na_2HPO_4.12H_2O$).

٣- ماء مقطر ١٢٠٠ مل (Distilled water).

وعند الاستعمال تخلط ١٣٥٠ مل من ١٪ جلوكوز + ٦٠ مل من محلول (١) +٩٠مل من محلول (ب) جيدا. ويفضل تعقيم كل مكون للمخلوط علي حدة لمدة ٢٠ دقيقة وتحت ضغط ٢٥ رطلا. كما يجب تعقيم الأواني الزجاجية وأطباق بتري والماصات المستخدمة.

تجربة إزالة القرص الجرثومي وزراعته

The Removal and Culturing of the Blastoderm

لإجراء ذلك يتبع التالي (الشكل رقم ٨,١):

١- يعد البيض المحضن لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٩°م للحصول على القرص الجرثومي المناسب للزراعة.

٢- قبل فتح البيضة يجب تركها حتى تأخذ درجة حرارة الغرفة، وهذا يمنع انفصال القرص الجرثومي عن الغشاء المحي أثناء المعاملات التالية.

٣- يبلل الطرف العريض من البيضة بقطعة من القطن المبلل بالكحول (٧٠٪)، لمنع حدوث التلوث أثناء فتح البيضة.

٤- تفتح البيضة بالطرق المعتادة لفصل النصف العلوي من الغشاء المحي المحمل بالقرص الجرثومي. ويكون القطع أسفل مستوى الخط المنصف للبيضة القريب

من الألبيومين، يجمع الألبيومين بواسطة قطارة معقمة، ثم يوضع في دورق مخروطي معقم له سدادة محكمة حتى لا يتلوث.

٥- يرفع الغشاء المحي الحامل للقرص الجرثومي عن المح بحرص شديد بواسطة طرفي ملقط معقم، ثم يوضع في زجاجة ساعة معقمة بها محلول بانيت كومبتون الملحي المعقم (Sterilized pannett-compton solution)، بحيث يكون الغشاء المحي إلى أسفل والقرص الجرثومي إلى أعلى.

٦- توضع الحلقة الزجاجية المعقمة (Sterilized glass ring) على الغشاء المحي بحيث يكون القرص الجرثومي في منتصف الحلقة الزجاجية تماما والحواف الخارجية للغشاء المحي خارجها.

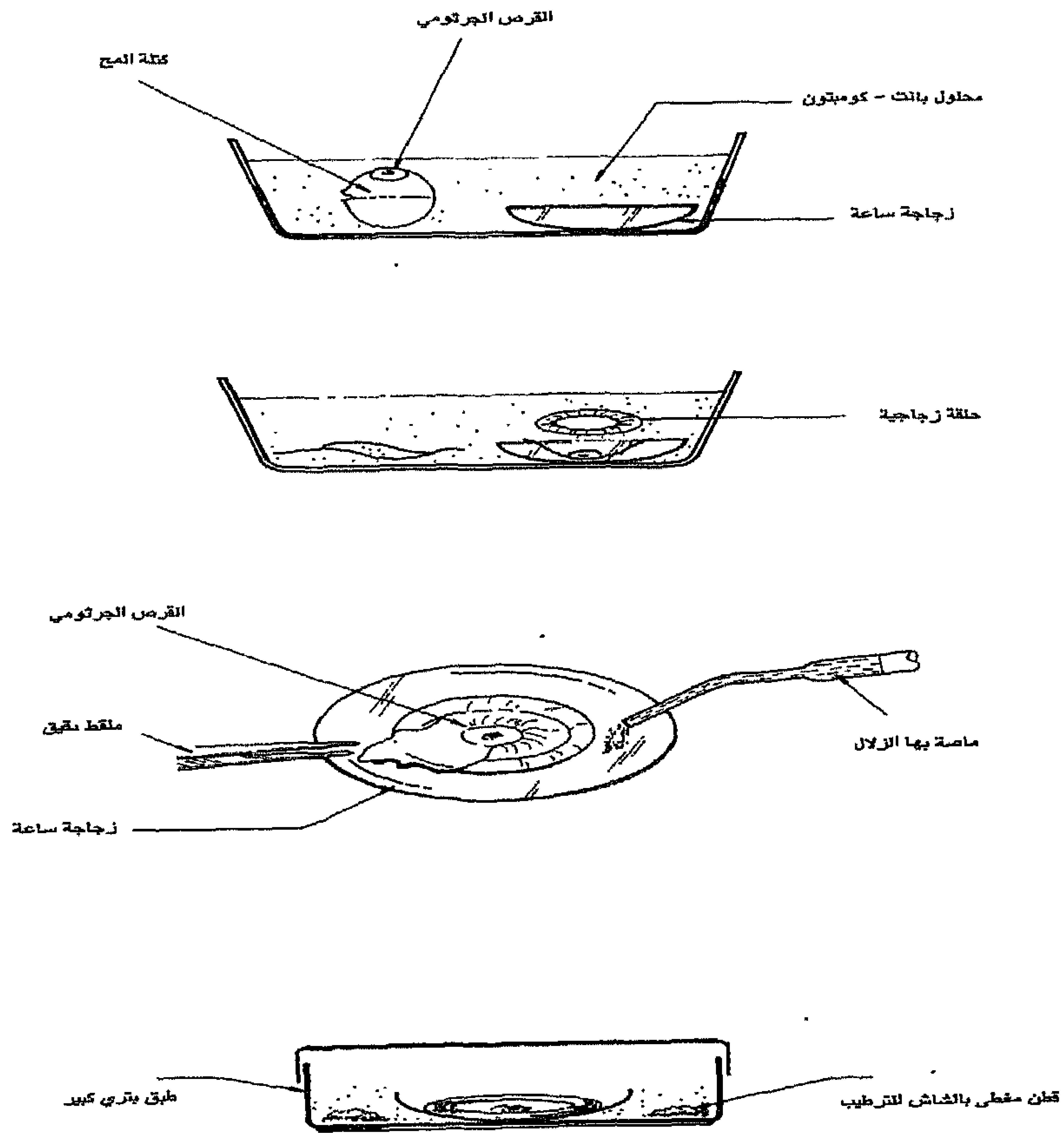
٧- تستخرج زجاجة الساعة ومحتوياتها من الحوض المستخدم في استخراج الجنين (الشكل رقم ٨،١)، ثم تزال الزيادة من المحلول الملحي بواسطة قطارة مدببة نظيفة ومعقمة، ثم تثنى حواف الغشاء المحي على جدار الحلقة الزجاجية مع تجنب شده بعنف، حتى لايتمزق ويتسرب الزلال إلى القرص الجرثومي فينمو الجنين نموا غير طبيعي، ثم يغسل القرص الجرثومي بالمحلول الملحي للتخلص من بقايا المح الموجودة به.

٨- يزال المحلول الملحي الموجود في زجاجة الساعة من فوق الجنين وأسفل الغشاء المحي، ثم يؤخذ بماصة معقمة ١ مل من الزلال الموجود في الدورق المخروطي ويوضع أسفل الغشاء المحي. توضع بضع قطرات من محلول بانيت كومبتون (Pannett Compton solution) علي سطح القرص الجرثومي لضمان بقائه رطبا في أثناء عملية التحضين.

٩- تنقل زجاجة الساعة إلى طبق بتري معقم له غطاء، ثم توضع به قطع من القطن المغطى بالشاش والمبلل بالمحلول الملحي المعقم. يغطى الطبق ثم يوضع في الحضان عند درجة حرارة ٣٩°م، ورطوبة نسبية تبلغ ٦٠٪ لمدة أربع وعشرين ساعة أخرى. وتعتبر هذه الطريقة ممتازة لمشاهدة نمو القلب والقطع العضلية وثنية الرأس

والجزر الدموية في جنين الدجاجة. يجب تجنب رفع غطاء الطبق البتري من آن إلى آخر، للحصول على رؤية جيدة حتى لا يتلوث الجنين.

تظهر شواهد التلوث بوجود مساحات بيضاء معتمة، نتيجة لتحلل الأنسجة الجنينية، والجدير بالذكر أن زلال البيضة يوجد به أنزيم الليسوزايم (Lysozyme) المضادة للنمو البكتيري (Anti Bacterial agent).



الشكل رقم (٨,١) رسم يوضح خطوات إزالة القرص الجرثومي وزراعته في طبق بتري.[١٥]

---

(١٥) كريم (١٤١١هـ).

تقرير العملي الثامن: زراعة القرص الجرثومي لجنين الدجاج

الاسم : .... الرقم : ....

سجل درجة حرارة الحضان ؟.....................ْم درجة الرطوبة النسبية : ....

١- كم كان عمر الجنين أثناء عمل التجربة ؟ العدد : ....

٢- ما اسم المحلول المستخدم في الزراعة ومما يتكون : ....

....

٣ - كم كان عدد البيض الذي تم إجراء التجربة عليه ؟ العدد : ....

٤- كم جنينا بقي حيا لمدة ٢٤ ساعة بعد فصله وزراعته ؟ العدد : ....

٥- ما أقصى حد وصل إليه نمو الأجنة (العمر بالأيام أو الساعات)؟.........................

٦- دوِّن ملاحظاتك في أثناء متابعتك لنمو الجنين بعد زراعته :

....

....

....

....

٧- عدد الأسباب التي أدت إلى عدم نمو الأجنة ثم إلى موتها :

....

....

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي التاسع

تحضير الشرائح الكاملة والقطاعات لجنين الدجاج

Preparation of Whole Mount and Sections Slides of Chick Embryos [١٦]

الهدف

تهدف هذه التجربة إلي تعلم عمل التحميل الدائم للأجنة علي الشرائح، وذلك لإجراء الفحوصات بشكل أدق علي الأجنة إذا ما أجريت عليها بعض التجارب لملاحظة بعض عيوب تكوين الجنين.

المواد والأدوات المستخدمة Materials

١- بيض مخصب ومحضن لفترة معينة حسب الحاجة (١٨-٧٢) ساعة.

٢- حضان.

٣- أدوات تشريح.

٤- أطباق بتري، قطارات، زجاجيات للتثبيت والصبغ وشرائح زجاجية وأغطيتها.

٥- محلول ملحي فسيولوجي (محلول لوك الفسيولوجي).

٦- مثبت بوان أو مثبت حمض الخليك الفورماليني (٠,٥٪ حمض الخليك +١٠٪ فورمالين).

٧- كربونات الليثيوم المذابة في كحول (٧٠٪).

---

(١٦) Harrison (1977).

٨- كحول بتراكيز مختلفة (٣٥٪، ٧٠٪، ٨٠٪، ٩٠٪، ٩٦٪، ١٠٠٪).

٩- زيت خشب السيدر (Ceder wood oil).

١٠- زيلين وشمع وجليسرين وحمض الهيدروكلوريك.

١١- صبغة الهيماتين (Hematin Stain) أو صبغة كارمين البوراكس (Borax carmine Stain).

١٢- جهاز لعمل القطاعات الشمعية للشرائح (ميكروتوم Microtome).

تحضير شريحة لجنين الدجاج بكامله

Preparation of whole mount chick embryo slide

للحصول على أجنة الدجاج يراعي الآتي :

١- يتم الحصول علي البيض من الدجاج البياض البلدي أو اللجهورن الأبيض (White leghorn)، لأن نسبة الإخصاب به تكون أعلى من أنواع الدجاج الأخرى ولأن قشرة هذا البيض الكلسية رقيقة بيضاء.

٢- أن يكون البيض مخصبا، وأفضل الأوقات للحصول عليه هو فصل الربيع (من فبراير إلى يونيو).

٣- يوضع البيض المخصب (قبل التجربة بيوم أو يومين) في حضان درجة حرارته تبلغ حوالي ٣٩°م (١٠٣ف) على المحور الطولي أو الأفقي، ويجب أن يقلب البيض بلطف من جانب إلى آخر كل ٢٤ ساعة إما آليا وأما يدويا.

٤- أن تكون نسبة رطوبة الحضان حوالي ٦٠٪.

٥- يحفظ البيض الذي لانريد تحضينه، في مكـــان بارد رطب درجة حرارته ما بين ١٠°م إلى ١٥°م ولمدة أسبوع واحد فقط، حتى لانحصل على أجنة نامية نموا غير طبيعيا.

٦- للحصول على جنين عمره ٣٣ ساعة، يوضع البيض في الحضان لمدة ٣٨ ساعة (هناك فرق ٥ ساعات لكي يأخذ البيض درجة حرارة الحضان (الجدول رقم ٩,١).

٧- للحصول على الجنين وإخراجه من البيضة اتبع نفس الخطوات التي اتبعتها في إزالة القرص الجرثومي وزراعتة في العملي الثامن أو باتباع الخطوات التالية (الشكل رقم ٩,١) :

أ) اكسر قشرة البيضة عند طرفها العريض وفوق الحيز الهوائي.

ب) أزل القشرة الكلسية وأغشيتها أسفل مستوى المح.

ج) أفرغ محتوى البيضة في وعاء به محلول ملحي فسيولوجي درجة حرارته ٣٩°م (١٠٣°ف) بلطف شديد (حتى لا يتمزق الغشاء المحي المحيط بالمح).

وإذا كانت التجربة للفحص فقط، فيكتفى بكلوريد الصوديوم (٠,٩٪ جرام). أزل القرص الجرثومي (Blastoderm) بواسطة مقص حاد وذلك بعمل قطع خارج المنطقة الوعائية (Vascular area) في الغشاء المحي، ثم اغمس زجاجة ساعة داخل الوعاء الذي يحتوي على الجنين الطافي والتقطه بها مع قليل من المحلول الملحي.

د) أزل الغشاء المحي (Vitelline membrane) بواسطة ملاقط مدببة الطرفين، ثم ضع القرص الجرثومي على لوح زجاجي أو مربع (١,٥×١,٥سم) من ورق الترشيح في زجاجة ساعة نظيفة لحفظه بطريقة دائمة (الشكل رقم ٩,١).

أو يمكن كسر البيضة ثم سكبها في طبق بتري يحتوي على محلول فسيولوجي، ثم اثنِ ورقة ترشيح صغيرة وقصها على شكل معين (بحجم الجنين) ثم وضعها بلطف على الجنين بحيث يبدو (الجنين) من الفتحة التي عملت، ثم تقطع أطراف الغشاء المحي الملتصق بالورقة الشفافة ونقل الجنين بها بعد ذلك.

بعد الحصول على القرص الجنيني اتبع الخطوات التالية:

١- اغسل القرص الجنيني لمدة نصف ساعة بماء الصنبور بشكل خفيف جدا للتخلص من الحبيبات المحية العالقة بالقرص الجنيني (يجب نقل الماء الجاري والتخلص منه بالقطارة دون المساس بالجنين).

٢- ثم انقل الجنين إلى تركيزات مخففة من الكحول كما هو متبع:

أ) ٥٠٪ كحول لمدة ساعة. ب) ٣٥٪ كحول لمدة ساعة.

٣- ضع الجنين في صبغة الهيماتين (Hematin Stain) لمدة ساعة [تتكون الصبغة من: ٢٥ جراما من الشب البوتاسي (Potassium alum) المذاب في ٥٠٠مل من الماء المقطر ثم أضف إليه تدريجيا (مع التحريك المستمر) نصف جرام هيماتين في ١٠ سم^{3} من كحول ٩٠٪ واستمر في التحريك لعدة دقائق. اترك المحلول نصف ساعة ثم رشحه واستخدم الراشح لصبغ الجنين].

٤- اغسل الجنين بالماء الجاري (ثلاثة تغييرات، ٥ دقائق لكل تغيير).

٥- أضف ٦ قطرات من حمض الهيدروكلوريك إلى ١٠٠ سم^{3} من كحول ٣٥٪ ثم يضاف على الجنين لتحويل لون الصبغ الأزرق للجنين إلى اللون الأحمر الوردي القاتم.

٦- انقل الجنين للماء الجاري عدة مرات واتركه ثلاث ساعات للتخلص من الحمض الزائد.

٧- انزع ماء العينة وذلك بتمريره على تركيزات تصاعدية من الكحول ٣٠٪، ٥٠٪، ٧٠٪ حتى تصل إلى كحول تركيزه ١٠٠٪.

٨- انقل الجنين إلي زيت خشب السيدر أو زيت القرنفل، واتركه حتى يصبح شفافا ثم اغسله بالزيلين لمدة ٣٠ دقيقة أو أقل.

٩- حمل الجنين على شريحة زجاجية وسط كندا بلسم (Canada balsam) ثم غطه بغطاء الشريحة (الشكل رقم ٩،١).

ملاحظة: يمكن استخدام صبغة بوراكس الكارمين (Borax carmin Stain) بدلا من الهيتامين، مع عمل التمايز بواسطة الكحول المحمض (Acidic alcohol) (١سم^{٣} حمض Hcl+ ١٠٠سم^{٣} كحول ٧٠٪).

ب) تحضير شرائح لقطاعات في جنين الدجاج

لتحضير شرائح لقطاعات في جنين الدجاج للدراسة الخلوية لأجزاء الجنين اتبع الخطوتين رقم ١ و ٢ السابقتين للحصول على جنين الدجاج ثم اتبع الخطوات التالية:

التثبيت Fixation

أزل جميع السوائل من زجاجة الساعة بواسطة قطارة تاركا القرص الجرثومي مفرودا على قطعة الورق لمنع التفاف حواف القرص الجرثومي. أضف قطرات من محلول بوان (Bouin's fluid) إلى القرص الجرثومي حتى يغطى تماما. وبعد نصف ساعة تقريبا، يكون الجنين قد أصبح صلبا، فيسحب بحرص شديد من على الورقة المقواة ويترك في المثبت.

مدة التثبيت تتراوح ما بين ٤ ساعات للأجنة المبكرة، و٤٨ ساعة للأجنة التي يزداد تحضينها لمدة ٣ أيام فأكثر.

إزالة اللون Decoloration

بعد عملية التثبيت، ضع على الجنين محلولا مركزا من كربونات الليثيوم (Lithium carbonate) المذاب في كحول ٧٠٪، للتخلص من اللون الأصفر لحامض البكريك الموجود في مثبت بوان (كربونات الليثيوم تذوب ببطء شديد في الكحول) أو في ٢-٣٪ من

هيدروكسيد الأمونيوم (NH_4OH) في كحول تركيزه ٧٠٪ أثناء عملية نزع ماء العينة، حتي يصبح أبيض اللون. تستغرق هذه العملية حوالي ٢٤ ساعة مع التغيير المستمر في الأجنة المتقدمة في العمر وأقل للأجنة المبكرة.

نزع الماء Dehydration

يتم نزع الماء باستخدام تركيزات تصاعدية من الكحول (٣٥٪ - ٥٠٪ - ٧٠٪- ٩٠٪-٩٦٪ -١٠٠٪) كما يجب أن يتم ذلك ببطء حتى لايتأثر الجنين. وللتأكد من إزالة الماء تماما. يراعى أن يكون بقاء العينة في كل من التركيزات السابقة ساعة للأجنة المبكرة وساعتين تقريبا للأجنة الأكثر تقدما في العمر. إذا لم يتم التخلص من اللون الأصفر لحمض البكريك، أضف إلى التركيزات الكحولية ٧٠، ٩٠٪ كميات قليلة من كربونات الليثيوم ($LiCO_3$)، ويفضل إجراء تغيرين لكل تركيز من تركيزات الكحول.

الترويق Clearing

بعد التخلص من الكحول المطلق، يغطى الجنين جيدا بزيت خشب السيدر Cedar wood oil لمدة ٢٤ ساعة أو أكثر (حتي يصبح شفافا)، ثم يتم نقله إلي الزيلين وتركه لمدة نصف ساعة.

الطمر Embedding

اطمر الجنين في شمع درجة انصهاره ٥٦ْم مضافا إليه نوعان من الشمع، ٥٪ لكل نوع بنسبة الوزن: 5% Bayberry.Wax 5% Bee wax.

تطمر الأجنة الصغيرة لمدة ساعة، أما الأجنة التي تصل أعمارها إلى ٩ أيام فأكثر فتطمر لمدة ساعتين تقريبا. بينما تطمر الأجنة المتأخرة التي تكونت بها بعض الغضاريف في مخلوط من شمع البرافين والمطاط بالتساوي (Paraffin: rubber mixture) لمدة تتراوح بين نصف ساعة وساعة واحدة.

القطيع Sectioning

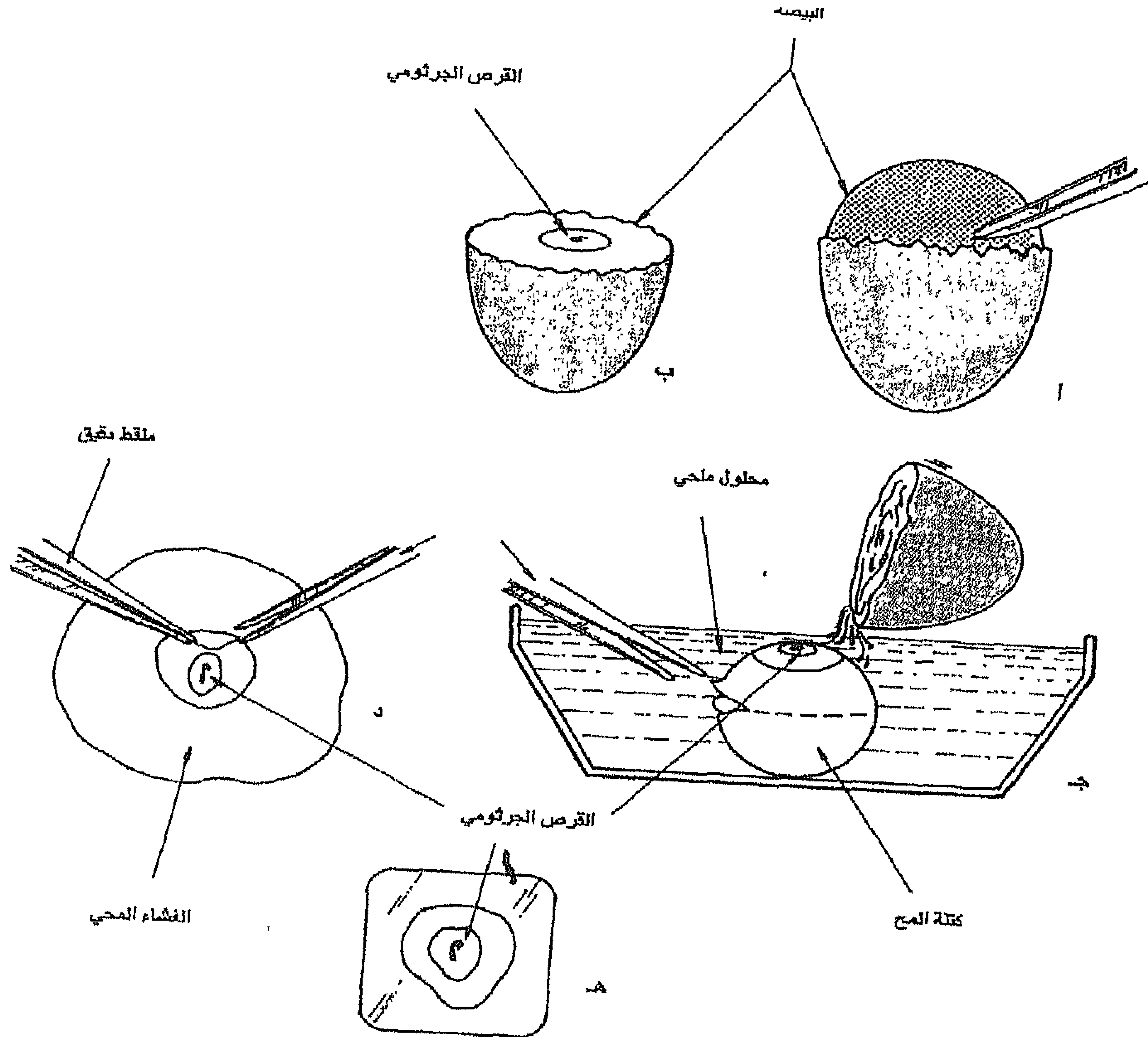
للدراسة الخلوية، يجب ألا يزيد سمك القطاعات عن ٧ ميكرون. أما بالنسبة لقطاعات الأعضاء، فيجب أن يكون سمك القطاعات حوالي ٥ ميكرون، ولكي تلتصق القطاعات جيدا بالشرائح الزجاجية النظيفة اتبع ما يلي:

أ) اغلِ قليلا من الماء المقطر ثم برده.

ب) أضف لكل ١٠سم٣ من الماء قطرة من الجليسرين والألبومين (لاصق ماير).

ج) اخلط جيدا، ثم ضع قليلا من مخلوط الألبومين والماء على الشريحة الزجاجية حتى يطفو عليه شريط القطاعات الشمعية.

د) عندما تنتهي من عمليتي فرد القطاعات وتوجيهها على الشريحة، ضعها على سخان الشرائح (درجة حرارته حوالي ٤٠ °م)، لتجف ثم اسحب المخلوط السابق (الزائد منه) بواسطة قطارة أو بورق الترشيح ثم أكمل تجفيف الشريحة. بعد تجفيف الشرائح يتم صبغها بإحدى الصبغات مثل بواركس الكارمين أو أي صبغة أخرى مناسبة، ثم تجرى عليها عمليات نزع الماء ثم يتم وضع الكندا بلسم لتغطيتها بغطاء الشريحة.



الشكل رقم (٩,١). يوضح خطوات الحصول على القرص الجنيني من البيضة وتحميلة على ورقة ترشيح ثم نقله على غطاء الشريحة.

الجدول رقم (٩,١) مراحل نمو جنين الدجاج في الحضان.

أرقام مراحل النمو	العمر التقريبي للتحضين (بالساعات) عند ٣٤,٧-٣٨,٨ ْم	عند ٣٩,٤ ْم
منطقة الخط البدائي		
١- القرص الجرثومي.	٤-٥	٤
٢- مرحلة تكوين الخط البدائي.	٦-٧	٦
٣- مرحلة متوسطة من الخط البدائي.	١٢-١٣	١١
٤- الخط البدائي كامل التكوين (منطقة الرأس).	١٨-١٩	١٨
٥- تكوين الرأس.	١٩-٢٢	١٩
٦- ثنية الرأس.	٢٣-٢٤	٢٠
منطقة القطع الجسمية		
٧- أول زوج من القطع الميزوديرمية.	٢٣-٢٦	٢١
٨- ٤ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٢٦-٢٩	٢٤
٩- ٧ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٢٩-٣٣	٢٧
١٠- ١٠ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٣٣-٣٨	٣٠
١١- ١٣ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٤٠-٤٥	٣٣
١٢- ١٦ أول أزواج من القطع الميزوديرمية.	٤٥-٤٩	٣٦
انثناء الجنين والتواؤه		
١٣- بداية انثناء الرأس (١٩ قطعة جسمية).	٤٨-٥٢	٤٠
١٤ - إنشاء كامل الرأس (٢٥قطعة جسمية).	٥٠-٥٣	٤٤
١٥- المخ المتوسط يصبح في المقدمة (٢٥ قطعة جسمية).	٥٠-٥٥	٤٨
١٦- مؤخرة المخ المتوسط تتقدم للأمام (٢٨ قطعة جسمية).	٥١-٥٦	٥٤
١٧- مقدمة المخ الخلفي تتقدم للأمام (٣١قطعة جسمية).	٥٢-٦٤	٦٠
١٨- بقية سقف المخ الخلفي تصبح في المقدمة (٣٥ قطعة جسمية).	٧٢	٦٥
مراحل براعم الأطراف		
١٩- طول البرعم الطرفي = ربع عرض انثناء الرأس.	٣ أيام	يومان
٢٠- طول البرعم الطرفي = نصف عرض انثناء الرأس.	٣,٥ أيام	٢,٥ أيام
٢١- طول البرعم الطرفي = عرض انثناء الرأس.	٤ أيام	٣ أيام

تقرير العملي التاسع:
تحضير الشرائح الكاملة والقطاعات لجنين الدجاج

الاسم : .... الرقم : ....

يقدم الطالب الشريحة (أو الشرائح) التي قام بعملها خلال هذا الجزء من العملي موضحا الاتي :

١- نوع الصبغة : ....

٢- ساعات التحضين : ....

٣- عمر الجنين : ....

٤- درجة حرارة الحضان أثناء تحضين البيض : ....

٥- إذا تم أخذ صور للجنين من الشريحة فتوضح قوة التكبير.................................

٦- ما مراحل تحضير الشريحة ؟ : ....

٧- ما أهمية كل مرحلة من مراحل تحضير الشريحة ؟ : ....

٨- اذكر أسماء المحاليل المستخدمة في كل مرحلة وطريقة المعاملة لها؟

....

....

٩- أرفق صورة للشريحة التي تم عملها لجنين الدجاج :

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

القسم الثالث

تجارب على أجنة الثدييات (الفأر)

Experiments on Mammalian Embryos (Mouse)

العملي العاشر

تأثير بعض المواد على إحداث التشوهات الخلقية في أجنة الفئران

Teratological Effecets of Some Materials in Mouse Embryos.

الهدف

يهدف هذا العملي إلى معرفة أي مدى يكون هنالك تأثير للتعرض للمواد أو تناول الأدوية خلال فترة الحمل على نمو الأجنة خلال مراحل التكوين المختلفة: هل في المراحل المبكرة (مرحلة التفلج والتبطين)، أم خلال مرحلة تكوين الأعضاء (التعضي)، أم في المراحل المتأخرة (مرحلة اكتمال تكوين الأعضاء). ويتم ذلك من خلال إجراء تجربة يتلخص إجراؤها في الآتي:

تحقن مجموعة من إناث الفئران المخبرية الحوامل بأحد العقاقير الشائعة الاستعمال أو مواد مشوهة للأجنة (كالإسبرين أو أحد المضادات الحيوية أو غيرها) وعلى فترات مختلفة من الحمل، ثم تتم مراقبة عملية تكوين الأجنة لمعرفة مدى التأثير الضار لهذه العقاقير.

أ) المواد والأدوات المستخدمة

- مجموعة من إناث الفئران الحوامل ٢٠-٣٠.
- أحد العقاقير (كالإسبرين Aspirin) أو الهايكونسيل (Hiconcil)، التتراسيكلين (Tetracycline) أو الميتومايسين – ج(Mitomycin-C (MMC.
- صناديق خاصة بتربية الفئران.

- إبر للحقن وأدوات التشريح.
- حاقنات للتجريع.

ب) طريقة العمل

١- توضع مجموعة من الإناث (١٥ أنثى مثلا) مع ذكور الفئران (٣ إناث مع كل ذكر) في كل قفص لتربية الفئران ثم يتم مراقبة الحمل لكل أنثى كل يوم في الصباح الباكر عن طريقة رؤية السدادة المهبلية (Vaginal plug) وهي عبارة عن سائل منوي متجلط يسد فتحة المهبل مما يدل على حدوث الجماع والذي يعتبر اليوم الأول للحمل ولبدء التجربة على الإناث.

٢- تقسم إناث الفئران الحوامل إلى ثلاث أو أربع مجموعات (٣-٥ إناث، على الأقل، في كل مجموعة) ثم توضع كل مجموعة في صندوق خاص بها ترقم كل أنثي وذلك بتلوين الذيل على شكل حلقة حول الذيل في طرفة أو وسطة مثلا خط دائري رقم ١ أو رقم ٢ وهكذا ثم توزن.

٣- يتم تحضير تركيز معين من العقار المراد حقنه (كالإسبرين) جم أو مجم/ مل (gm or mg/ml).

٤- تحدد كمية المحلول المحتوي على العقار (بالمل) طبقا لوزن الأنثى والجرعة المعينة.

من المعادلة التالية: الكمية المطلوبة = $\frac{\text{الجرعة (مجم/كجم)} \times \text{الوزن (جم)}}{\text{تركيز العقار (مجم/ مل)}}$

٥- بعد أن تحدد الجرعة (Dose) المراد إعطاؤها للإناث الفئران الحوامل يتم إيصال المادة إما عن طريق حقن الإناث الحوامل بالتجويف البريتوني للجسم أو التجويف البطني وأما عن طريق التجريع وذلك بإداخال حاقنة التجريع عن طريق جانب الفم ثم إلى تجويف البلعوم ثم المرئ مع التأكد بعدم دخول حاقنة التجريع إلى القصبة الهوائية، ويفضل استخدام جرعتين مختلفتين أو أكثر ولكل مجموعة جرعة خاصة بها.

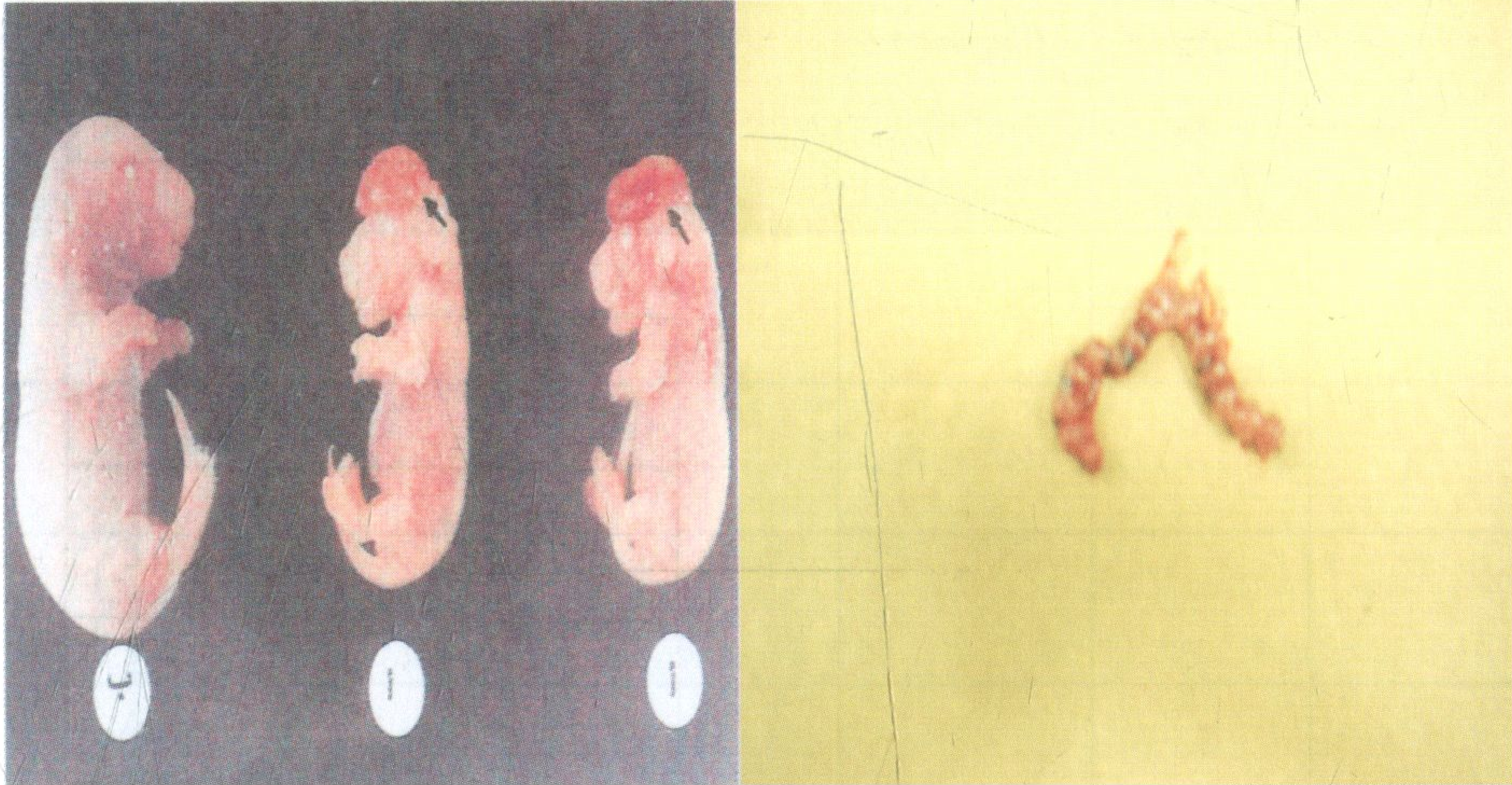
٦- تحقن إناث المجموعة الأولى في اليوم الثاني أو الثالث من الحمل (مراحل التكوين الجنيني المبكر، التفلج) بإحدى الجرعات إما عن طريق الحقن بالأبرة بالتجويف البريتوني وأما بالتجريع عن طريق الفم بحاقنة تجريع.

٧- تحقن إناث المجموعة الثانية في اليوم السابع أو التاسع من الحمل (مراحل تأسيس تكوين الأعضاء) بالجرعة السابقة نفسها أو باستخدام جرعة أخرى.

٨- تحقن إناث المجموعة الثالثة في اليوم الحادي عشر أو الثاني عشر من الحمل (مراحل اكتمال نمو الأعضاء) إما بالجرعة نفسها أو باستخدام جرعة أخري.

٩- تحقن إناث المجموعة الضابطة (الرابعة) بالمحلول المذيب (Vehicle) (فقط بالجرعة نفسها أما الجرعات المستخدمة).

١٠- تشرح كل أنثى في اليوم التاسع عشر من الحمل، ثم تستخرج الأجنة وتعد ثم توزن و تفحص لمعرفة ما إذا كان للعقار أي تأثير تشوه خلقي أم لا وذلك بمقارنة أجنة المجموعة الضابطة بأجنة المجموعة المعالجة (الشكل رقم ١٠,١).



الشكل رقم (١٠,١). صورة توضح تأثير العقاقير (المتوميسين Mitomycine C) على إحداث التشوهات الخلقية في أجنة الفئران.

الأولى توضح أجنة ممتصه في الرحم بعد ١٩ يوما من الحمل.

الصورة الثانية تأثير مادة الميتومسين سي على نمو أجنة الفئران: الجنين (أ) فيه نمو المخ خارج الجمجمة (المخ الخارجي Exencephaly) مع صغر حجم ووزن الجنين مقارنة بالجنين السليم (ب).[١٧]

---

(١٧) Abou-Tarboush, *et.al.* (1994).

ترصد البيانات المتحصل عليها من كل أنثى من المجموعات المختلفة ثم توضع في الجدول التالي:

رقم الأنثى	نوع المجموعة	الجرعة (مجم/كجم)	عدد الأجنة				أوزان الأجنة	متوسط وزن الأجنة	عدد وزن الأجنة	التشوهات الملاحظة على الأجنة	ملاحظات أخرى
			حي	ميت	امتصاص	العدد الكلي					

تقرير العملي العاشر:

تأثير بعض المواد على إحداث التشوهات الخلقية في أجنة الفئران

الاسم : .... الرقم : ....

يقدم الطلبة (في مجموعات) النتائج التي حصلوا عليها لكل مجموعة مع تحليل هذه النتائج وتعليلها، كتقرير لهذا العملي.

تأثير عقار... على أجنة فئران تم الحصول عليها في اليوم السابع عشر من الحمل.

الجرعة (مجم/كجم)	عدد الإناث المستخدمة	عدد مواقع الانغراس (المتوسط + الخطأ المعياري)	عدد الأجنة (المتوسط+ الخطأ المعياري)	الامتصاص %	وزن الجنين الحي المتوسط+ الخطأ المعياري)	العيوب المشاهدة

تستخدم التحاليل الإحصائية للتوصل فيما إذا كان هناك تأثير للعقار على الأجنة المتحصل عليها من أمهات عولجت بالعقار، مقارنة بالمجموعة الضابطة.

تقطع ورقة التقرير العملي وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الحادي عشر

تحديد دورة الشبق بواسطة المسحة المهبلية للفأر

Detection of Estrous Cycle by the Vaginal Smear of Mice(18)

مقدمة

تعتبر الفئران المخبرية (Laboratory mice) من أكثر الحيوانات الثديية استخداما في التجارب، وذلك لسهولة الحصول عليها ورخصها وسهولة تربيتها والتعامل معها، بالإضافة إلى توافر سلالات نقية عديدة منها، وقصر فترة الحمل والحصول على أجنة عديدة منها (للمزيد عن استخدام الفئران وأهميتها يمكن الرجوع لصفحة الملحق).

في هذا العملي سوف نقوم بتحديد مراحل دورة الشبق في الفئران من خلال فحص المسحة المهبلية. تتميز إناث الثدييات بالتغيرات النسيجية لبطانة الجهاز التناسلي أثناء مراحل الدورة التناسلية والتي تكون تحت تأثير الهرمونات الجنسية.

تتكون الدورة التناسلية أو الشبق (Estrous cycle) في الفئران من أربع مراحل تستغرق ما بين ٤-٥ أيام.

مراحل الدورة التناسلية في الفأر

١- مرحلة قبل الشبق (Proestrus)

وهي المرحلة التي تسبق فترة قبول الأنثى للذكر وقبيل خروج البويضات من المبيض، وتستغرق حوالي ١٨ ساعة تقريبا. تكون الخلايا الطلائية المهبلية خلال هذه المرحلة

---

(١٨) Rugh (1968).

ذات أنوية كبيرة بالنسبة للسيتوبلازم، ويصحبها عدد قليل من كريات الدم البيضاء (متعددة أو مشكلة النواة) (انظر الشكل رقم ١١,١أ).

٢- مرحلة الشبق (Estrus)

وهي المرحلة التي تظهر فيها الأنثى قبولا للذكر، وتستغرق حوالي ٢٥ ساعة، يحصل خلالها التبويض والتلقيح بين الذكر والأنثى، ويلاحظ انتفاخ الجلد حول فتحة المهبل نوعا ما، كما أن بطانة المهبل تكون ذات خلايا قرنية حرشوفية بدأت في فقدان أنويتها (الشكل رقم ١١,١ب).

٣- مرحلة ما بعد الشبق (Metestrus)

وهي المرحلة التي تلي عملية الشبق، وتستغرق حوالي ٨ ساعات فقط، وتتميز هذه المرحلة بالآتي:

- يكون المبيض مليئاً بالأجسام الصفراء (نتيجة لخروج البويضات من الحويصلات المبيضية).
- ظهور كثير من الخلايا الدموية البيضاء في مسحة نسيج المهبل ومعها خلايا طلائية قرنية وعدد قليل من الخلايا الطلائية الحرشفية ذات الأنوية، (الشكل رقم ١١,١جـ).

٤- مرحلة نهاية الشبق أو السكون الجنسي (Diestrus)

يكبر خلال هذه المرحلة حجم الأجسام الصفراء. وتحتوي مسحة المهبل على خلايا طلائية ذات أنوية، كريات دموية بيضاء وكمية قليلة من المخاط. وتستغرق هذه المرحلة حوالي ٥٥ ساعة تقريبا (الشكل رقم ١١,١د).

طريقة عمل مسحة من المهبل لفحص مراحل الدورة التناسلية (دورة الشبق)

الأدوات والمواد المستخدمة Materials:

١- مجموعة إناث من الفئران (إما أن تكون مفصولة لمدة وأما كانت موضوعة حديثا مع الذكور).

٢- ماصة زجاجية (لأخذ مسحة من المهبل).

٣- شرائح زجاجية نظيفة وأغطية لها.

٤- كحول (تراكيز ٧٠٪-٩٠٪)

٥- صبغة الهيماتوكسلين والأيوسين أو أزرق المثيلين.

٦- زيلين.

٧- أنية لصبغ الشرائح – محلول ملحي.

٨- كندا بلسم أو DPX.

طريقة عمل التجربة Methods

١- حاول أن تختار مجموعة من إناث الفئران المعزولة عن الذكور، ومن صناديق مختلفة لاستعمالها للفحص.

٢- ضع الأنثى على شبك صندوق تربية الفئران، وامسكها من ذيلها.

٣- أدخل طرف ماصة زجاجية أو الإبرة غير الحادة في المهبل وأدرها ثم اسحبها من المهبل.

٤- امسح محتويات الأنبوبة أو الإبرة على شريحة زجاجية نظيفة، ثم اتركها لمدة بسيطة لتجف.

٥- ضع قطرات بسيطة من المثبت (١ إثير: ١ كحول) على الشريحة التي عليها المسحة.

٦- اغمس الشريحة في صبغة الهيما توكسلين (Ehrlich's haematoxlyin).

٧- ثم اغسلها بماء الصنبور (بشكل خفيف).

٨- انقل الشريحة إلى كحول قاعدي لمدة دقيقة.

٩- ثم اغمسها في كحول ٩٠٪.

١٠- اصبغها بصبغة الأيوسين الكحولية (Alcoholic eosin) بغمسها لمدة دقيقة فيه.

١١- تغسل بكحول تركيزه ٩٠٪.

١٢- انقلها إلى كحول ١٠٠٪ مرتين.

١٣- روقها في الزيلين.

١٤- غط الشريحة (بعد وضع الكندا بلسم عليها) بواسطة غطاء الشريحة.

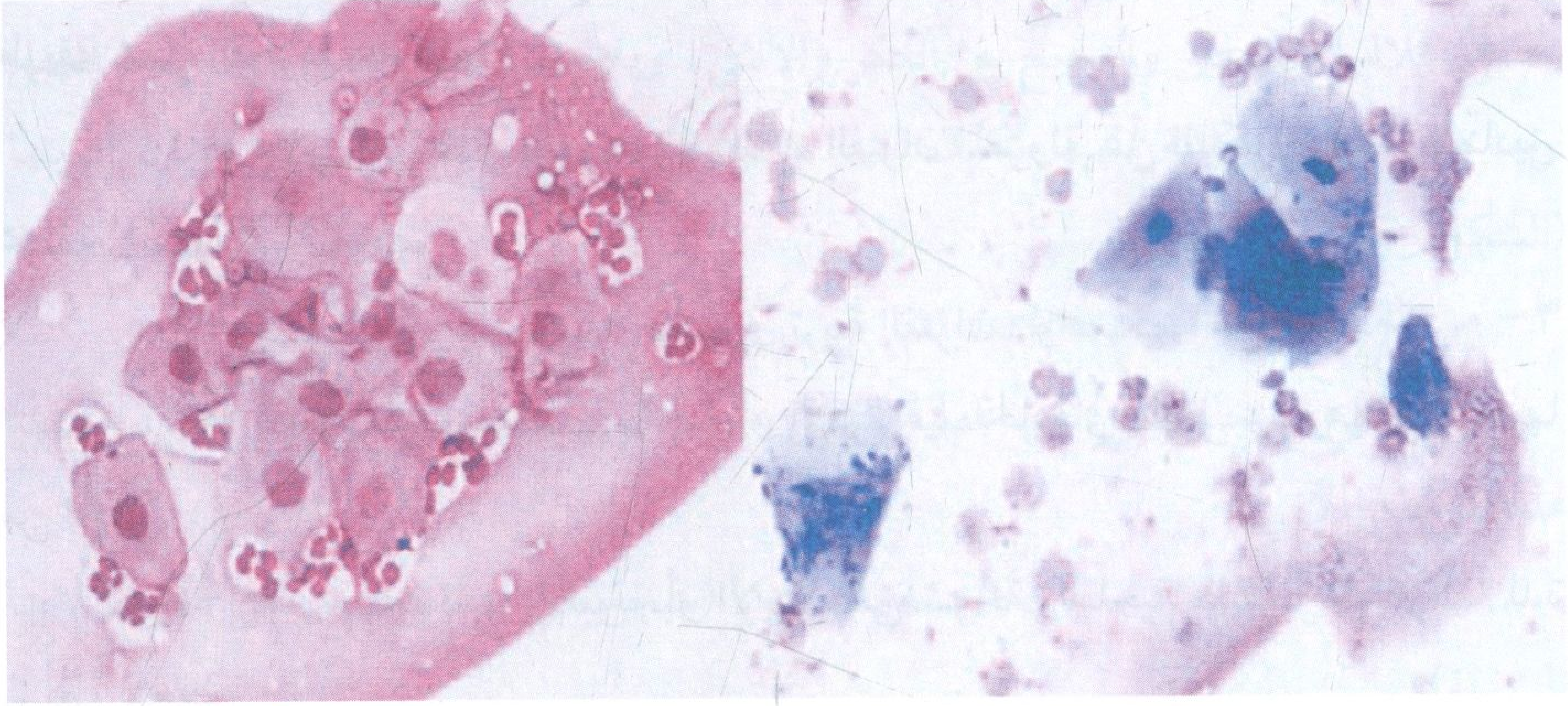
كما يمكن متابعة الدورة التناسلية للأنثى نفسها، وذلك بأخذ عينات على فترات (كل ١٢ ساعة تقريبا) وصبغها بالتلويدين الأزرق بشكل سريع لمعرفة المرحلة وطول الفترة، ثم سجل ملاحظاتك عنها.

أ) ماقبل الشبق Proestrus

تكون الخلايا الطلائية المهبلية حرشوفية خلال هذه المرحلة ذات أنوية كبيرة بالنسبة للسيتوبلازم ويصحبها عدد قليل من كريات الدم البيضاء.

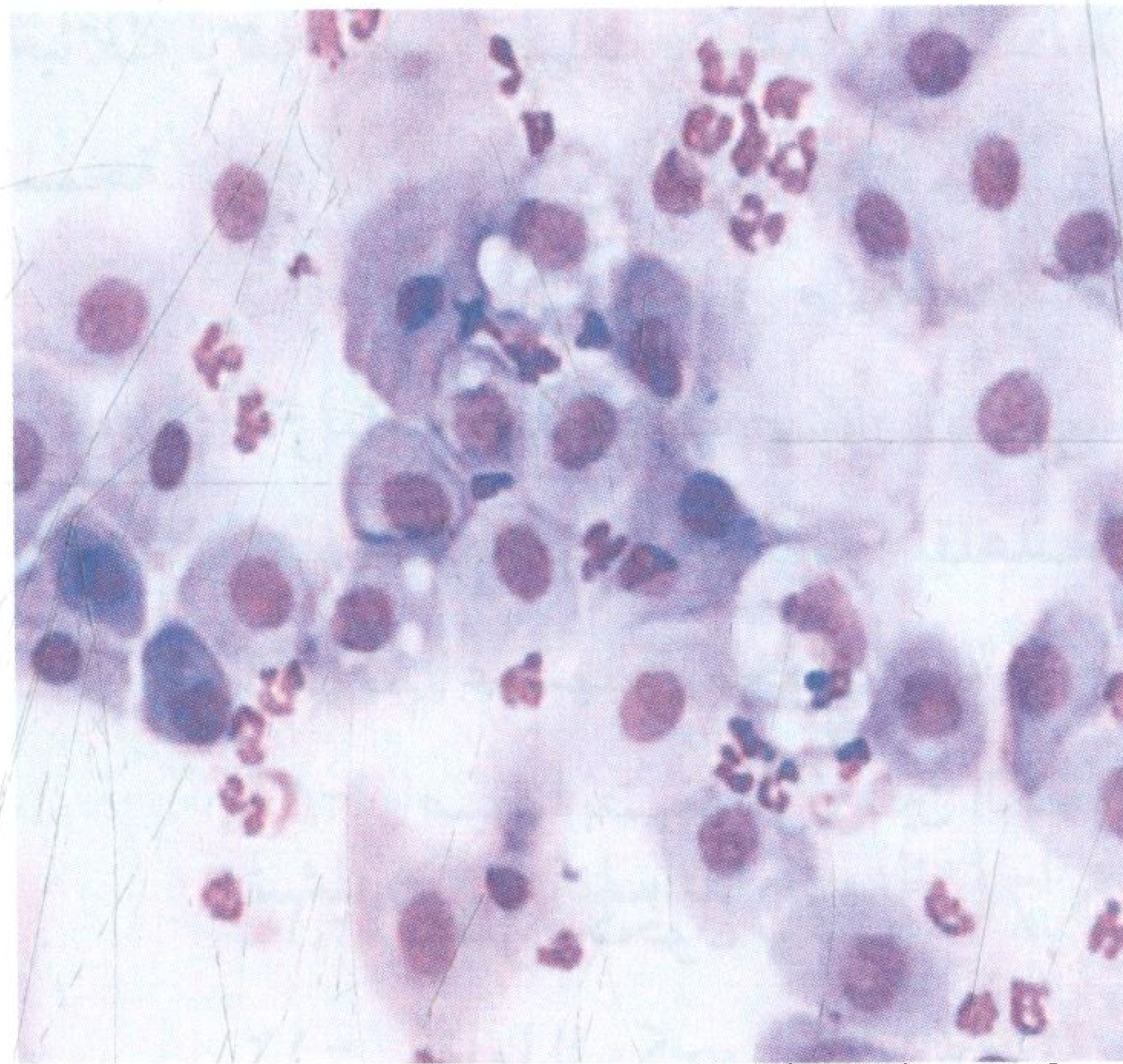
ج) مرحلة مابعد الشبق Meta estrus

ظهور كثير من الخلايا الدموية البيضاء في مسحة نسيج المهبل ومعها خلايا طلائية قرنية وعدد قليل من الخلايا الطلائية الحرشفية ذات الأنوية.









ب) مرحلة الشبق Estrus

بطانة المهبل تكون ذات خلايا حرشوفية بدأت في فقدان أنويتها.

د) مرحلة نهاية الشبق Diestrus

تحتوي مسحة المهبل على خلايا طلائية ذات كريات دموية بيضاء وكمية قليلة من المخاط.

الشكل رقم (١١,١). صور توضح المراحل المختلفة لخلايا بطانة المهبل في أثناء الدورة التناسلية في الفأر (صبغة أزرق التلودين). (300X).

تقرير العملي الحادي عشر:
تحديد مراحل دورة الشبق بواسطة فحص المسحة المهبلية للفأر

الاسم : .... الرقم : ....

يقدم الطالب الشرائح التي قام بإعدادها مع تعريفها وشرح مبسط لكل واحدة منها بالترتيب الآتي :

الشريحة (أ) : ....

الشريحة (ب) : ....

الشريحة (جـ) : ....

الشريحة (د) : ....

كم أنثى تم فحص المسحة المهبلية فيها؟ : ....

كيف تعرفت على المسحة للأنثى التي خارج أو نهاية الشبق Diestrous ؟

....

ما الفروق الرئيسية التي من خلالها تتعرف على شريحة المسحة المهبلية لتحدد مرحلة الشبق للأنثى ؟

....

....

....

كيف تفرق بين شريحة المسحة المهبلية التي قبل الشبق Proestrous والتي بعد الشبق Metaestrous ؟

....

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الثاني عشر

الإخصاب الاصطناعي الخارجي وزراعة أجنة الفأر
In vitro Fertilization and Embryo Culture of Mice [١٩]

الهدف

يهدف هذا الدرس إلى تعلم عملية تنشيط المناسل في الإناث بواسطة الحقن بالهرمونات التناسلية، ثم استخراج البويضات وإخصابها خارجيا في الطبق (IVF) (*In virto* fertilization) (وهي تماثل لما يعمل في طفل الأنابيب) لمتابعة تكوين ونمو الأجنة خلال مرحلة التفلج في بيئة زراعة الأجنة خارجيا في الطبق (*In vitro*).

الأدوات والمواد المستخدمة

١- مجهر تشريحي مع أدوات تشريح.

٢- صفيحة لتسخين الشرائح (٣٧,٥مْ).

٣- أنابيب دقيقة.

٤- إبر بأحجام مختلفة.

٥- هرمونات تناسلية : (الهرمون المحفز لنمو الحويصلات FSH، هرمون التبويض أو الهرمون الأصفر LH، أو الهرمون المشمي البشري hCG).

٦- أطباق بتري صغيرة معقمة .

---

(١٩) Alhimaidi (1999).

٧- مرشحات (فلاتر) بأحجام مختلفة، ومخبار مدرج سعة ١٠٠سم[٣].

٨- حضان مزود بأسطوانة يحتوي على ٩٥٪ هواء + ٥٪ ثاني أكسيد الكربون .

٩- ورق قصدير .

١٠- زيت البرافين.

١١- كحول (لتعقيم المكان).

١٢- ماء مقطر ٣ مرات (في ثلاث حاويات زجاجية للتقطير).

١٣- بيئة للإخصاب ولتنمية الأجنة، وهي إما أن تباع جاهزة مثل بيئة رقم إم ٢، إم ١٦(من شركة سيجما) بيئة البوتاسيوم المتوازنة أو على شكل بودرة مثل بيئة هام ف ١٠ (M2,M16 or potassium simple optimize medium) (KSOM) يضاف إليها مصل دم العجل فيما بعد.

إنتاج الأجنة خارجيا (في الطبق)

طريقة إجراء التجربة

تتكون التجربة من الخطوات التالية :

١- تحفيز المبايض بواسطة الهرمونات التناسلية، لإنتاج أكبر كمية من البويضات.

٢- جمع الحيوانات المنوية.

٣- جمع البويضات، ثم إجراء عملية الإخصاب خارجيا في الطبق ومتابعة نمو الأجنة.

وفيما يلي سنتناول بالشرح في كل خطوة على حدة كما يلي:

أولاً: تحفيز المبايض في الإناث لإنتاج البويضات

أ) تحقن مجموعة من الإناث (ويفضل الصغيرة العمر التي تبلغ من العمر ٦-٨ أسابيع) بالهرمون المحفز لنمو الحويصلات (FSH) وبكمية ١٠ وحدات دولية في التجويف البطني قبل يومين من إجراء التجربة .(حوالي الساعة الرابعة عصرا).

ب) بعد ٤٨ ساعة من الحقن تحقن نفس الإناث بالهرمون المكون للجسم الأصفر في المبايض (الهرمون الأصفر LH) بالكمية نفسها وبالطريقة السابقة نفسها، وذلك لإخراج أكبر كمية من البويضات من المبيض إلى قناة البيض.

في يوم التجربة:

جـ) تحضر البيئة الخاصة بالإخصاب، ثم تحضر البيئة اللازمة لتنمية الأجنة في صباح اليوم التالي وذلك بعد ١٤-١٦ ساعة.

١- يتم تحضير البيئة بإضافة الماء المقطر الخالي من الأيونات والمعقم بواسطة جهاز التعقيم (حسب الكمية المحتاج إليها) إلى مكونات بودرة البيئة الجاهزة (مثل هام ف ١٠ Ham F-10) ماعدا ألبيومين سيرم العجل(Bovine SerumAlbumin BSA) الذي يضاف بعد عملية التهوية. أو أن تستخدم بيئة جاهزة الصنع مثل (M2 &M16 from Sigma,or KSOM).

٢- يتم تهوية البيئة المحضرة بالمعمل وذلك بغمس أنبوبة زجاجية معقمة موصلة إلي أسطوانة تحتوي علي ٩٥٪ هواء + ٥٪ ثاني أكسيد الكربون ٣-٥ دقائق، ثم يضاف إليها سيرم ألبيومين العجل (Bovine SerumAlbumin BSA) .

٣- تعقم البيئة بواسطة مرشح التعقيم ثم يقسم علي مجموعة من الحاويات الزجاجية المعقمة ذات الأغطية المحكمة ويؤخذ منها مايناسب التجربة (٥٠مل مثلا) وتحفظ البقية في الثلاجة.

ثانياً: جمع الحيوانات المنوية من الذكور Sperm collection

• يتم قتل الذكور بواسطة النخنيع (أي فصل العمود الفقري عند الرقبة Cervical diloction).

• تستخرج الخصي ويجهز البربخ لكي يقطع من طرفيه (الشكل رقم ١٢,١).

• يعصر البربخ بين الإصبعين، وعلى رأس الإبرة يمكن جمع قطرة الحيوانات المنوية الخارجة من البربخ، ثم يوضع ذلك في طبق فيه قطرة دافئة من بيئة الإخصاب (٠,٥ مل) تترك الحيوانات المنوية في الحضان لمدة ١٠-١٥ دقيقة على الأقل.

ثالثاً: جمع البويضات Ova Collection

• يتم جمع البويضات من الإناث بعد ١٦ ساعة على الأقل من وقت الحقن (ومباشرة بعد جمع الحيوانات المنوية).

• يتم استخراج البويضات من الإناث عن طريق قتل الأنثى بالطريقة التي قتلت بها الذكور نفسها (الشكل رقم ١٢,١).

• تستخرج قناة البيض ثم يشق الجزء المتضخم منها (القارورة أو الأمبولا Ampulla) بواسطة إبرة دقيقة (تحت المجهر التشريحي)حيث تكون البويضات على شكل كتلة (الشكل رقم ١٢،٢).

• يتم نقل البويضات وما يحيط بها من الخلايا الحويصلية إلى بيئة أخرى (بواسطة أنبوبة ناقلة) مزودة بإنزيم الهايلورونيديز (Hyaluronidase) لمدة بسيطة (٢-٥دقائق) لتفكيك الخلايا الركامية من حولها.

رابعاً: الإخصاب الإصطناعي الخارجي في الطبق (IVF) *In vitro* fertilization

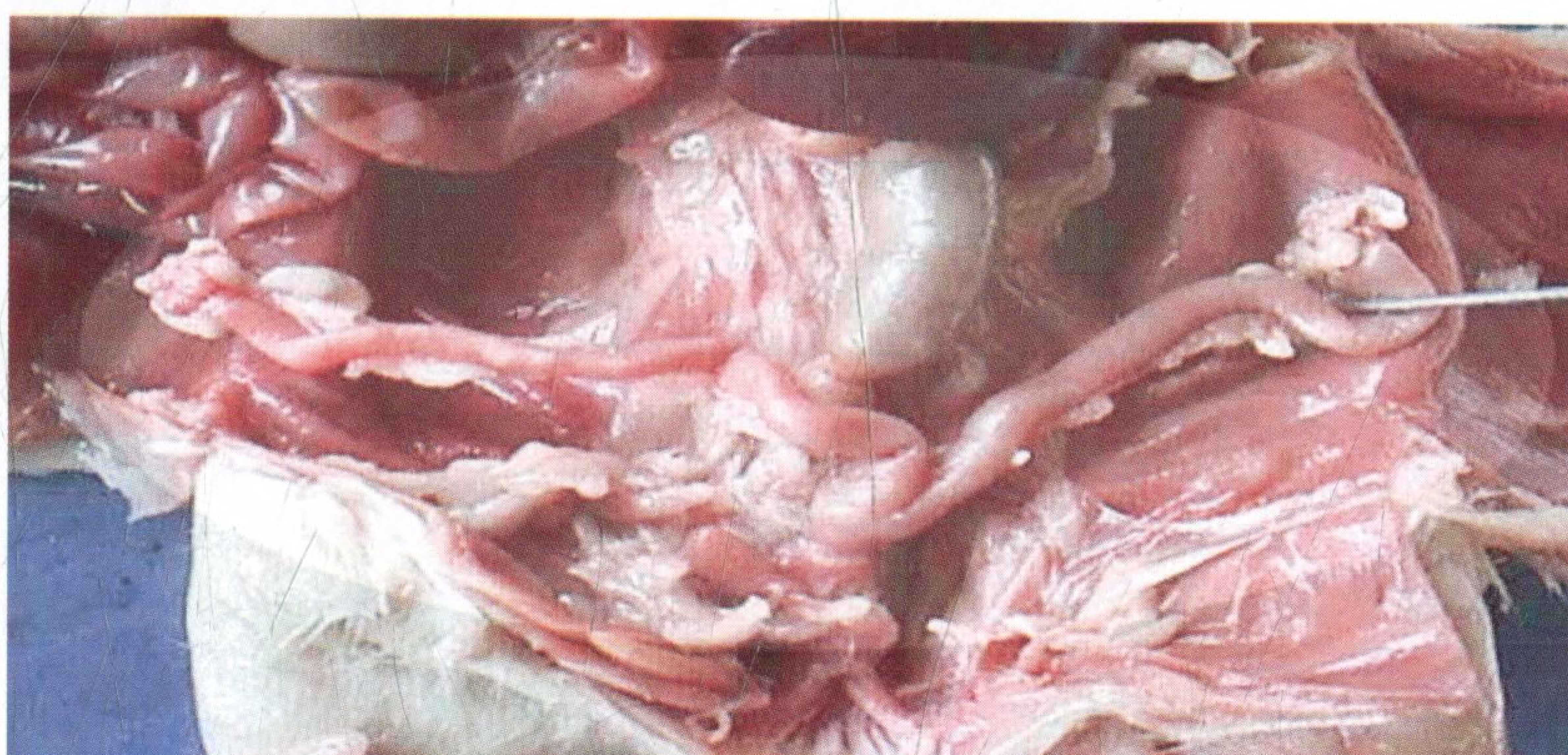
• تنقل البويضات إلى طبق صغير فيه بيئة إخصاب (٠،٥ مل).

• تضاف الحيوانات المنوية بالتركيز المطلوب مثلا ($٢×١٠^{٦}$) (يتم عد الحيوانات المنوية بالطريقة نفسها التي يتم فيها عد كريات الدم الحمراء أو بواسطة جهاز عد الحيوانات المنوية) إلى طبق البويضات لمدة ١-٢ ساعة وتترك في الحضان لإخصاب البويضات.

• بعد حوالي ٢-٤ ساعات، تنقل البويضات إلى بيئة تنمية الأجنة (M16 or KSOM) ويتم متابعة نموها عن طريق مراقبتها يوميا وتسجيل الملاحظات عن نمو الأجنة وذلك بعد نقلها إلى نقاط من البيئة في طبق آخر، وتتم تغطيتها بزيت البرافين، ثم مقارنة نموها (الشكل رقم١٢،٣) وتحديد أعمارها خلال ٢٤، ٤٨ ساعة .

أ) استخراج الخصية والبربخ (قطع ذيل البربخ وجزء من الوعاء الناقل) عصر البربخ بين إصبعى اليد.





ب) الجهاز التناسلي لأنثى فأر مشرحة (قناة البيض الملتفة قرب الدبوس على اليمين).

الشكل رقم (١٢,١). صور توضح خطوات جمع الحيوانات المنوية بتشريح ذيل البربخ وجزء من الوعاء الناقل للحصول على الحيوانات المنوية (على رأس الإبرة) في ذكر الفأر.[٢٠]

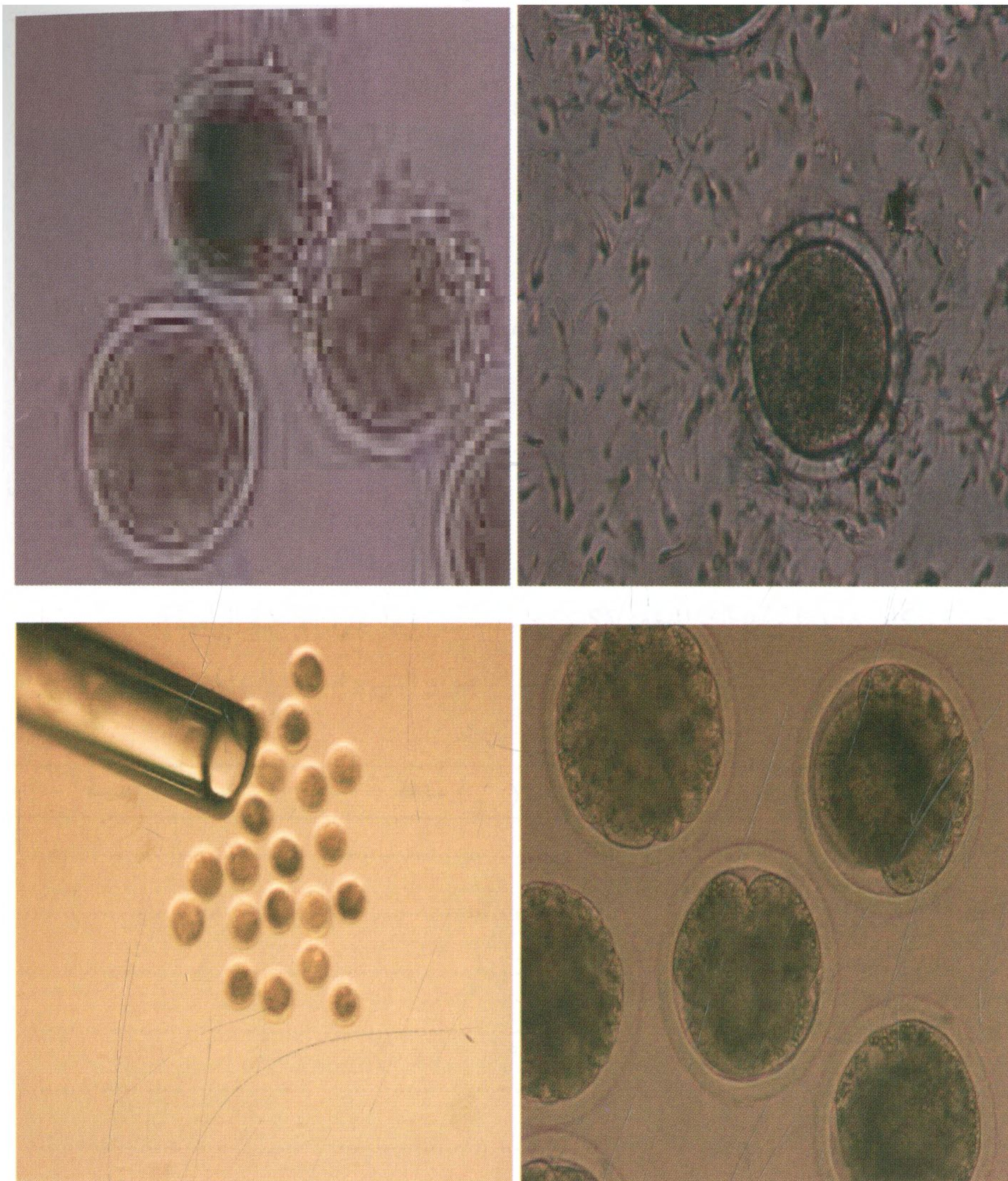
---

(٢٠) الحميدي وآخرون (١٤١٨هـ).



الشكل رقم (١٢,٢ أ،ب). صورة توضح طريقة استخراج البويضات من قناة البيض للفأر.

حقن سائل داخل تجويف قناة البيض (بمسكها بالملقط)، أو بتنسير منطقة القارورة من قناة البيض تحت المجهر التشريحي (مشار إليه بالسهم (أ)). ثم خروج البويضات وحولها الخلايا الحويصلية في الصورة الأخرى (ب).



الشكل رقم (١٢,٣). صورة للإخصاب الإصطناعي الخارجي (IVF) ونمو الأجنة في الثدييات.

تقرير العملي الثاني عشر:
الإخصاب الاصطناعي الخارجي ونمو الأجنة في الثدييات (الفأر)

الاسم : .... الرقم : ....

١- ما نوع البيئة التي استخدمت في التجربة؟..

- هل هي محضرة بالمعمل : أم جاهزة التحضير (سائلة أو بودرة)؟

٢- ما الهرمونات التي استخدمت ؟

اسمها : .... كميتها : ....

وقت الحقن : .... موقع الحقن : ....

٣- كم كان عدد الإناث التي حقنت؟ .... وما عدد البويضات المستخرجة؟............

٤- كم كان عدد البويضات المخصبة؟.................. وما عدد الأجنة النامية؟.................

٥- أقصى مرحلة وصلت إليها الأجنة (حدد الأطوار التي وصلت إليها):

عمــر الجنين	بعد ( ) ساعة	عــدد الأجنــة
طور الخليتين	....	....
طور الخلايا الأربع	....	....
طور الخلايا الثماني	....	....
طور الست عشرة خلية	....	....
طور التوزتية	....	....
طور المفلجة	....	....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الثالث عشر

جمع الأجنة ونقلها في الفأر
Embryo Collection and Transfer in Mice [٢١]

الهدف

إن الهدف من هذا العملي هو التدرب على كيفية الحصول على الأجنة ومعرفة عمر الأجنة المراد جمعها من الفئران المخبرية ثم نقلها إما بعملية جراحية أو بدون عملية جراحية في الفأر.

الأدوات والمواد المستخدمة

• إناث فئران حوامل/ مجهر تشريحي ومجهر مقلوب العدسة/محلول فسيولوجي مع بيئة تنمية (M2) الأجنة مضاف لها منظم للأس الهيدروجيني.

• **تتلخص عملية جمع الأجنة والحصول عليها من إناث الفئران فيما يلي:**

١- تُجرى عملية التزاوج بين كل من الإناث والذكور قبل بداية التجربة وعلى حسب عمر الأجنة المراد الحصول عليها وجمعها، ثم تعزل الإناث عن الذكور.

يحدث الإخصاب في الفئران في منتصف الليل غالبا (حوالي الساعة الثانية صباحا)، ويحدد برؤية السدادة المهبلية (التي تسد فتحة المهبل) والتي يمكن رؤيتها في الصباح الباكر من اليوم التالي للقاء الذكر بالأنثى (الجماع) (الشكل رقم ١٣,١-١٣,٢) وهذا اليوم يعتبر صفرا بالنسبة لعمر الأجنة (انظر الجدول رقم ١٣,١).

---

(٢١) Daniel (1971).

٢- يتم إعداد البيئة الخاصة المراد جمع الأجنة فيها في يوم إجراء التجربة، كما يجهز الحضان والأدوات الخاصة بجمع الأجنة، من إبر للتشريح وأدوات وماصات لنقل الأجنة وأطباق لجمع الأجنة.

٣- بعد تجهيز الأدوات والبيئة الخاصة بجمع الأجنة، تقتل الإناث المراد جمع الأجنة منها بواسطة التخنيع (وذلك بوضع الأنثى على غطاء القفص الخاص بتربية الفئران وبوضع طرف المقص أو الإبهام على مقدمة الرأس من أعلى وسحب الذيل من الخلف باليد الأخرى، لشل حركة الأنثى وفصل العمود الفقاري).

٤- تشرح الإناث بعد ذلك وتفصل قناة البيض، ثم توضع في البيئة الخاصة، ثم باستخدام المجهر التشريحي يتم إما حقن قناة البيض بمحلول فسيولوجي أو بمحلول بيئة أو تنسير وتقطيع القناة بواسطة إبرة التشريح أو الملقط المدبب إلى قطعة صغيرة داخل طبق التشريح المحتوي على البيئة.

٥- تُزال أجزاء قناة البيض ويفحص محتوي الطبق تحت قوة تكبير تسمح برؤية تحت المجهر التشريحي.

٦- نقل الأجنة من الطبق الذي تم فيه تقطيع القناة بواسطة الماصات الصغيرة إلى طبق أصغر يحتوي على بيئة للغسيل.

٧- تجري بعد ذلك التجارب الخاصة والمراد إجراؤها على الأجنة. توضع الأجنة تحت نقاط صغيرة من البيئة في طبق تنمية الأجنة، ثم تغطى هذه النقاط بزيت البرافين لمنع تغير البيئة وتبخرها ولسهولة متابعة الأجنة ودراستها تحت هذه النقاط (الشكل رقم ١٣,٣). ثم توضع في الحضان درجة حرارتة ٣٧ مْ والمزود بالهواء وثاني أكسيد الكربون ٥٪ (CO_2 5%).

نقل الأجنة Embryos Transfer

يمكن نقل الأجنة إلى أنثى أخرى مستقبلة إما أن تكون من سلالة أخرى تختلف عن سلالة الإناث التي جمعت منها الأجنة وعمر الأجنة فيها أقل بيوم عن عمر الأجنة المنقولة، إما أن تكون ذات حمل كاذب وذلك بوضع الإناث المستقبلة قبل (٣-٤) أيام من وقت النقل مع ذكر مخصي (Vasectemized male). يتم تسجيل وقت التلقيح ورؤية السدادة المهبلية فيها، لكي تنقل إليها الأجنة.

طرق نقل الأجنة في الفأر

هناك طريقتان لنقل الأجنة في الفئران:

أ) بدون عملية جراحية (أو النقل غير الجراحي): ونسبة نجاحها ٨-١٠ ٪ تقريبا.

ب) بالعملية الجراحية (النقل الجراحي): ونسبة نجاحها ٣٠-٤٠٪ تقريبا.

أ) **نقل الأجنة بدون عملية جراحية: Nonsurgical Embryo Transfer**

• تستخدم الأناث (الحاضنة) التي تم عمل تلقيح كاذب لها بوضعها مع ذكر مخصي قبل عملية النقل أو (أنثى ملقحة طبيعيا لكن لابد أن تختلف من حيث السلالة عن الأنثى التي سوف تؤخذ منها الأجنة (المانحة)) بحيث يكون عمر الأجنة المراد نقلها اكبر بيوم من يوم رؤية السدادة المهبلية للأنثى المستقبلة المراد نقل الأجنة إليها (الحاضنة).

• يتم الحصول على الأجنة من الإناث الملقحة (المانحة) بعد يوم أو يومين من رؤية السدادة المهبلية بتشريح الإناث واستخراج قناة البيض ثم عمل غسيل لتجويف قناة البيض أو بتنسيرها لاستخراج الأجنة منها. كما يمكن نقل الأجنة الناتجة من تجربة التلقيح الاصطناعي الخارجي (IVF) حسب الطريقة المذكورة سابقا ثم يتم تحديد الأجنة وأعمارها واختيار الأجنة المرغوب في نقلها.

• يتم نقل الأجنة بواسطة أنبوبة ماصة زجاجية دقيقة غير حادة الطرف الأمامي متصلة بحقنة (١مل) تشفط فيها الأجنة المرغوب نقلها في كمية من البيئة المحتوية على الأجنة (٥٠ ميكرون تقريبا) بين فقاعتين من الهواء بداخل تجويف الأنبوبة الدقيقة.

• تمسك الأنثى الحاضنة (ذات الحمل الكاذب) من ذيلها وهي فوق شبك صندوق الفئران وترفع للأعلى قليلا، ثم تتم محاولة إدخال طرف الأنبوبة أو الماصة الدقيقة والتي فيها الأجنة عن طريق إدخالها عبر فتحة المهبل، ثم عبر منطقة عنق الرحم (الشكل رقم ١٣,٢)، بعد تجاوز طرف الماصة منطق عنق الرحم يتم حقن أو تفريغ الأجنة داخل تجويف الرحم.

بعدها يتم متابعة الإناث التي تم نقل الأجنة إليها وتسجيل النتائج بعد الولادة بـ١٥-١٧ يوما من بداية يوم نقل الأجنة.

ب) نقل الأجنة جراحيا Surgical embryo transfer

تتم عملية الحصول على الأجنة من الإناث المانحه حسب الطرق المذكورة سابقا ثم يتم تجهيز الأجنة في قطرة من البيئة وتتم تغطية القطرة بالزيت المعدني (Mineral oil) ثم توضع في الحضان لحين مرحلة نقلها.

تتم عملية نقل الأجنة بالعملية الجراحية بتخدير إحدى الإناث ذات الحمل الكاذب بواسطة حقنها بمادة مخدرة من مادة الكيتامدور (كيتامدور ١٠٪ Ketamador) بتركيز ١٪ وبكمية ٠,٠٥ مل في عضلة الفخذ.

يتم إزالة الشعر من أحد جانبي الظهر حول منطقة تواجد قناة البيض ويتم مسح الجلد بمسحة كحول.

يتم عمل قطع صغير في الجلد لكي يتم استخراج قناة البيض وتثبيتها على ورقة ترشيح معقمة صغيرة (الشكل رقم ١٣,٤) ثم توضع الأنثى تحت المجهر التشريحي.

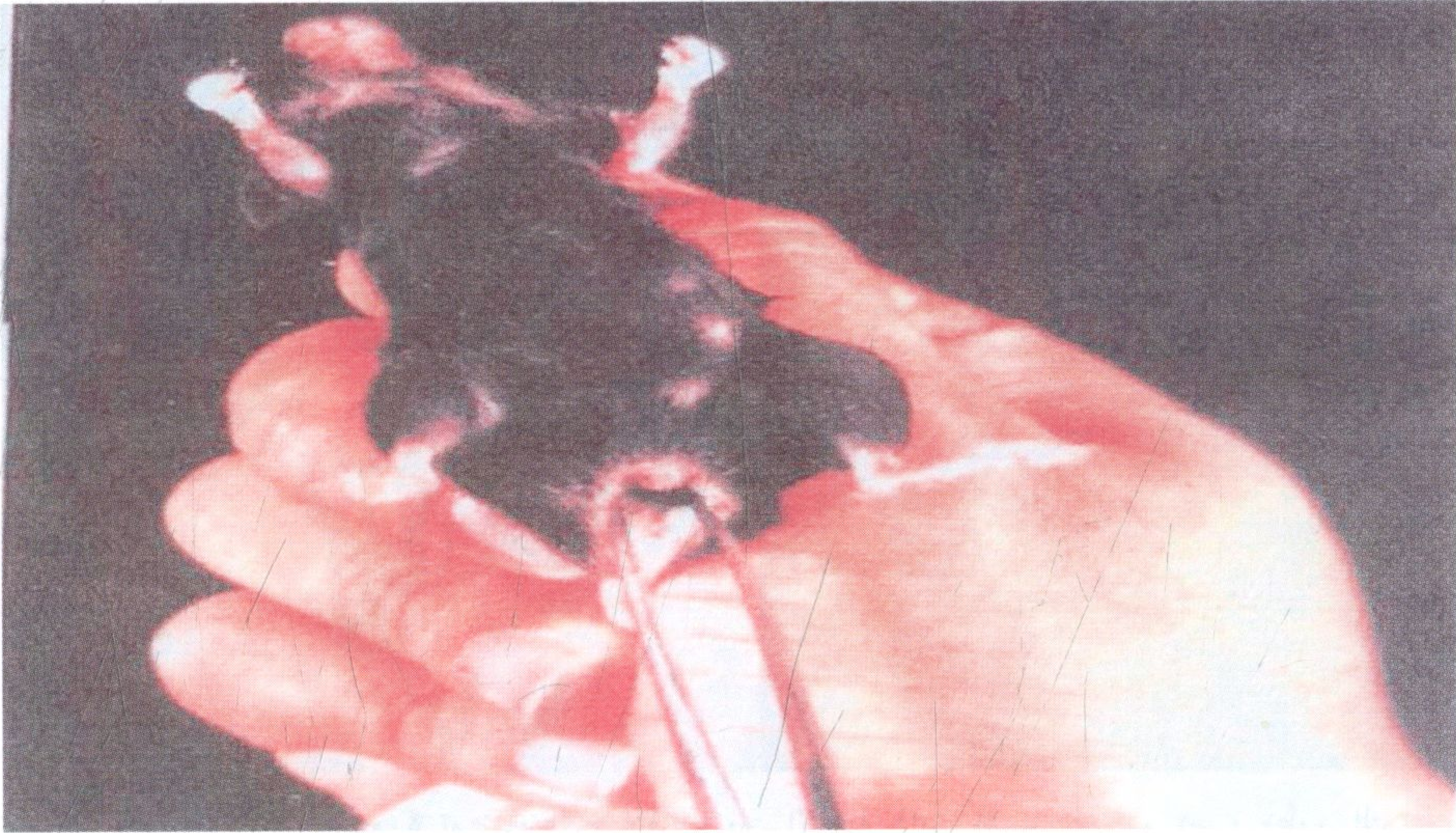
يتم سحب الأجنة المراد نقلها مع كمية بسطية من البيئة (١٠ ميكرولتر) بواسطة أنبوبة زجاجية دقيقة (أو إبره نقل الأجنة غير مدببة الطرف) ثم يدخل طرف الأنبوبة من خلال فتحة قناة البيض ثم تحقن الأجنة داخل تجويف قناة البيض.

يتم عمل خياطة الجرح بواسطة خيوط الجراحة ويغلق الجلد خارجيا بواسطة تدبيس الجلد بالدبابيس الجراحية ثم يعقم الجرح بالكحول وتترك الأنثى في مكان دافئ (تحت مصباح ضوئي في الصندوق) حتى تفوق من المخدر.

بعد يومين يمكن إزالة الدبابيس من الجلد ثم تتابع الإناث المنقول إليها الأجنة لحين الولادة بعد ١٧- ١٩ يوم تقريبا.

الجدول رقم (١٣,١). يوضح مراحل أعمار الأجنة المبكرة وأماكن تواجدها في الفأر والأطوار التي تمر بها منذ إخصاب البويضات داخليا إلى طور المفلجة.[٢٢]

المرحلة وأطوارها	العمر بالساعات	مكان وجود الأطوار
عملية الإخصاب وتكوين طور الخليتين	صفر-١٦ (يوم الإخصاب)	الجزء العلوي من قناة المبيض
(انقسام التفلج الأول)	٢٦-٢٤	الامبولا Ampulla
طور الخلايا الأربع	(اليوم التالي للإخصاب)	الثلث الأول من قناة البيض
(انقسام التفلج الثاني)	٢٤-٣٦	الجزء المتوسط من قناة البيض
طور الخلايا الثماني		الجزء المتوسط من قناة البيض
(انقسام التفلج الثالث)	٢٦-٤٨	الجزء الأخير من قناة البيض
طور الـ١٦ خلية		الجزء الأخير من قناة البيض
(انقسام التفلج الرابع)	٤٨-٦٠	وقد يكون في بداية قرن
طور الـ٣٢خلية		الرحم
(طور التوتية المبكرة)	٤٨-٧٢ (٣أيام)	في قرن الرحم للأنثى
طور البلاستيولا	٧٢-٨٦ (٣,٥ يوما)	

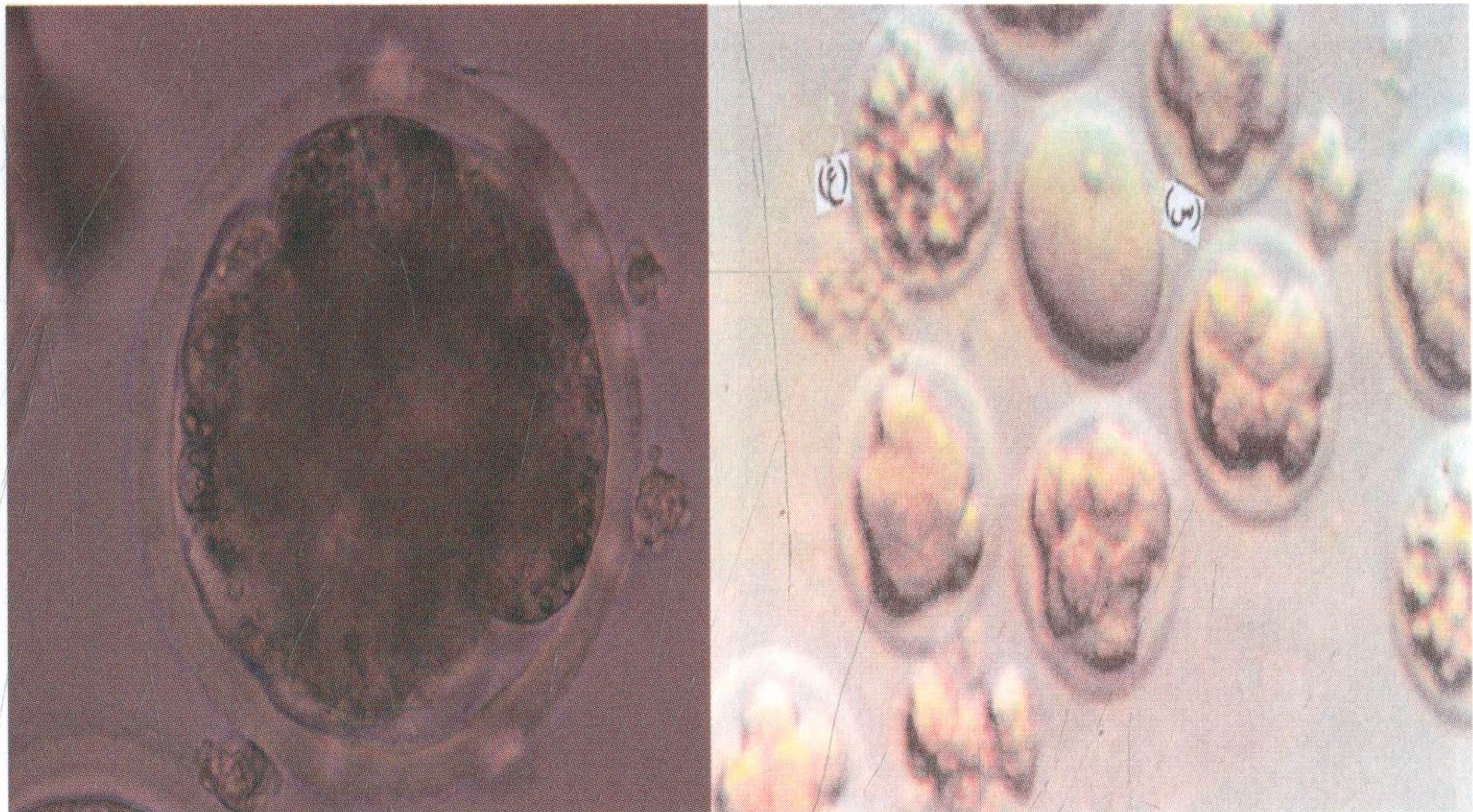


الشكل رقم (١٣,١). صورة توضح طريقة الإمساك بالفأرة وفحص السدادة المهبلية.

(٢٢) الحميدي وآخرون (١٤١٨هـ).



الشكل رقم (١٣,٢). صورة توضح طريقة الإخصاب الاصطناعي الداخلي أو نقل الأجنة بدون عملية جراحية.



الشكل رقم (١٣,٣). صورة توضح الاختلافات بين الأجنة ذات النمو السليم (س) (طور التوتية)، والأجنة غير السليمة (غ) (×١٢٠). جنين في طور التوتية.

عن طريق عمل قطع صغير في الجلد حول منطقة قناة البيض ثم تستخرج قناة البيض وتثبت على ورقة ترشيح لنقل الأجنة إليها تحت المجهر التشريحي.



الشكل رقم (١٣,٤). صورة توضح طريقة نقل الأجنة بالعملية الجراحية أو جراحيا.

تقرير العملي الثالث عشر:
جمع الأجنة من الفئران المخبرية ونقلها.

الاسم : .... الرقم : ....

سجل نتائج التجربة التي قمت بإجرائها ثم قدم تقريراً مرفقاً بحيث يحتوي على :

عدد الأجنة المتحصل عليها من الإناث المانحة..

وعمرها أو مرحلة طور..

حدد نوع عملية نقل الأجنة :

بعملية جراحية.................................. أو بدون عملية جراحية...

- عمر الأجنة المنقولة : .... عددها : ....

الأم المستقبلة متى تم رؤية السداد المهبلية فيها ؟..

- هل تم إجراء تجربة على الأجنة قبل نقلها ؟..
- ما نوع التجربة؟..
- ما النتائج التي تم الحصول عليها بعد إجراء التجربة ؟...
- وما عدد الأجنة التي تمت ولادتها؟...
- اذكر خطوات جمع ونقل الأجنة موضحا شروط نقل الأجنة ؟

....

....

....

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الرابع عشر

تحضير الشرائح لجنين الثدييات في المراحل المبكرة
Slides Prepration of Mammalian Early Embryo [٢٣]

الهدف

يهدف هذا العملي إلى تعلم طريقة تحضير الشرائح وصبغ الأجنة في الثدييات في المراحل المبكرة من النمو، مرحلة التفلج، بغرض دراسة الشكل الخارجي والتركيب الداخلي للأجنة المبكرة في الثدييات (الفأر).

طرق دراسة الشكل الخارجي لفلجات الأجنة المبكرة في الفأر (معدلة عن Daniel 1971)

جهز الأجنة المراد عمل شرائح منها، كما تم وصفه في الدرس العملي السابق من إناث تم مراقبة عملية التلقيح ورؤية السدادة المهبلية ثم تشريح الإناث بعدها بيوم أو يومين لاستخراج الأجنة من قناة البيض، ثم بعد الحصول على الأجنة اتبع الآتي:

١- ضع الأجنة في زجاجة ساعة أو على شريحة مقعرة أو على شريحة زجاجية مثبت عليها حلقة صغيرة لتحصر قطرة الأجنة في مثبت هيدنهن سوسا (Heidenhein susa fixatine) لمدة ٥ دقائق.

٢- انقل الأجنة إلى محلول لوجول (Lugol solution) لمدة ٥ دقائق، للتخلص من كلوريد الزئبق حتى لا يتدخل مع الصبغة.

---

(٢٣) Daniel (1971).

٣- اغسل الأجنة بالماء المقطر لمدة دقيقة أو دقيقتين (بالتقطير عليها) ثم يتم سحب الماء بطرف ورقة ترشيح.

٤- ضع قطرة من زلال البيض يبلغ حجمها حوالي ٢-٣ ملم على شريحة زجاجية نظيفة وجافة، ثم احقن الأجنة داخل القطرة بقليل من الماء ثم تخلص من الألبيومين الزائد نتيجة لذلك.

ملحوظة: يجب إجراء الخطوات المرقمة من ١-٤ تحت مجهر تشريحي، كما يجب وضع المحاليل في زجاجات ساعة خاصة بالأجنة أو وضع قطرات المحاليل على لوح زجاجي، ثم نقل الأجنة من قطرة إلى أخرى بالاستعانة بماصة لها فتحة يمكن التحكم فيها ومتصلة بحقنة صغيرة.

٥- انقل الشريحة المحملة بالأجنة وسط الألبيومين إلى زجاجة خاصة بالأجنة تحتوي على كحول إثيلي ٩٦٪، لتثبيت الألبيومين بأبخرة الكحول، بعد هذه الخطوة يمكن معالجة الشريحة كما في شرائح التحضيرات النسيجية الأولية.

٦- اغمس الشريحة أولا في كحول تركيزه ٥٠٪ (يمكن حفظها ليلة كاملة).

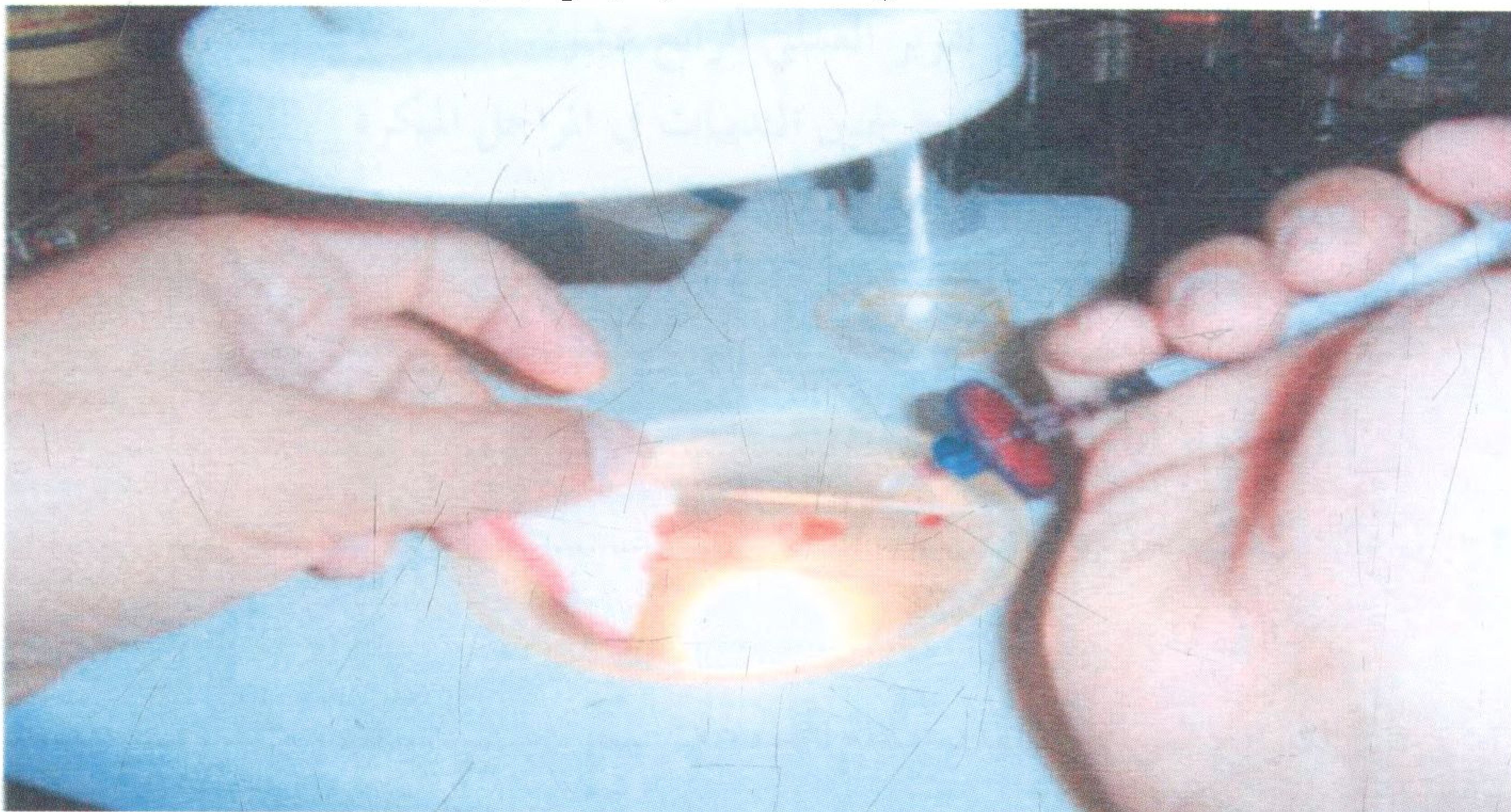
٧- اغمس الشريحة بالتتابع في الهيماتوكسلين، ثم في كحول تركيزه ٥٠٪ مضافا إليه بضع قطرات من حامض الهيدروكلوريك العياري، حتى يتحول الألبيومين إلى اللون الأبيض.

٨- اغمس الشريحة في الماء الجاري لمدة ٥ دقائق.

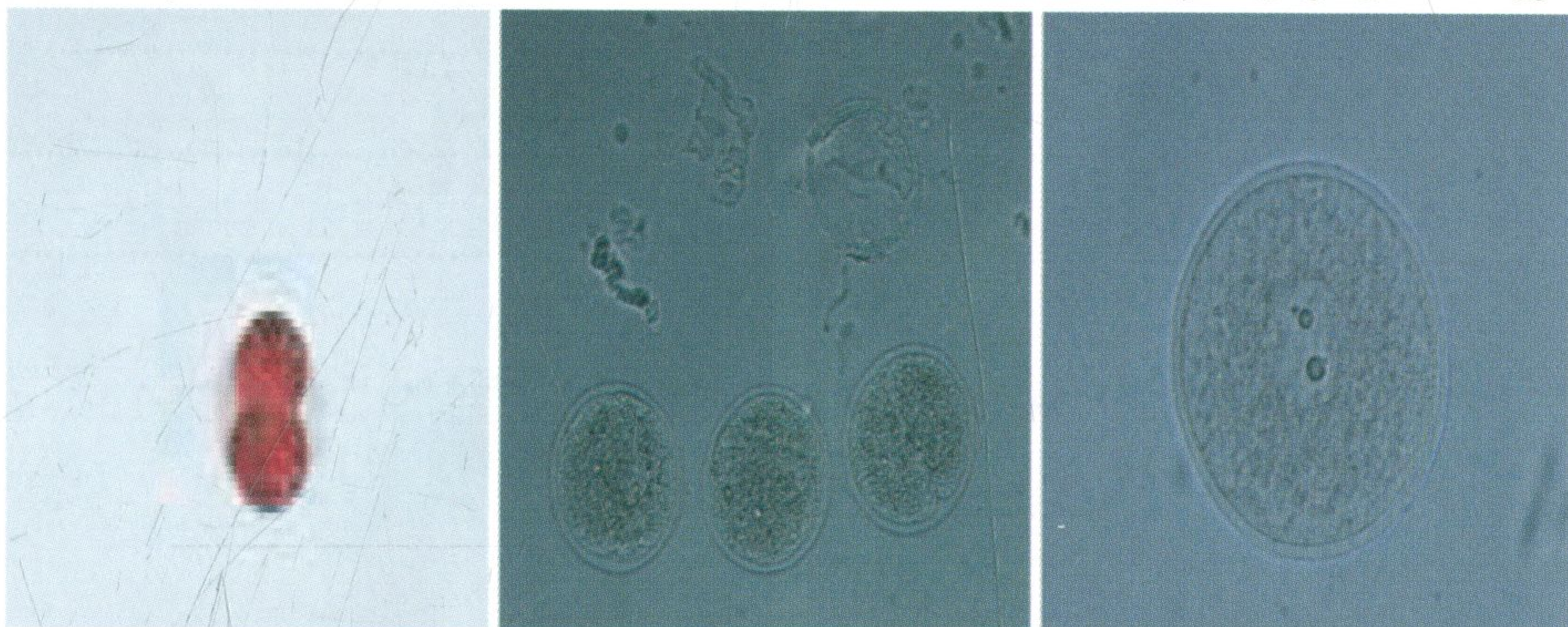
٩- انزع ماء الصبغة بتمريرها على سلسلة تصاعدية من الكحولات ٥٠٪، ٧٠٪، ٨٠٪ ٩٠٪، ٩٦٪، ١٠٠٪ مرتين لمدة ٥ دقائق.

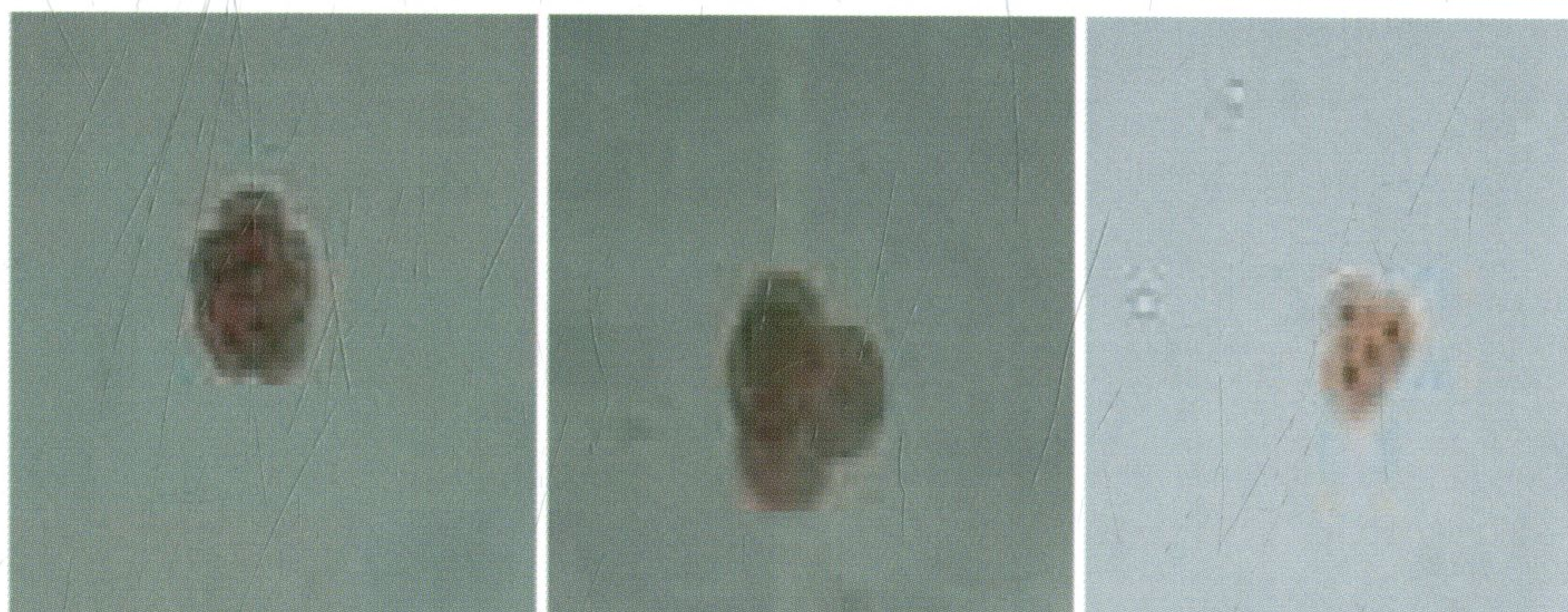
١٠- روق العينة بوضعها في الزيلين مرتين لمدة ٥ دقائق.

١١- غط العينة بغطاء الشريحة بعد أن تضع عليها قطرة أو قطرتين من كندا بلسم ثم صور عينات الأجنة (الشكل رقم ١٤,١).



طور الخلية أو الزيجوت (200X) طور الخليتين (100X)





طور الأربع خلايا (100X) طور ٨-١٦ خلية (100X)

الشكل رقم (١٤,١). صور طريقة صبغ لشرائح الأجنة في مراحل نمو مختلفة تحت المجهر التشريحي.

تقرير العملي الرابع عشر:
تحضير الشرائح لجنين الثدييات في المراحل المبكرة

الاسم : .... الرقم : ....

١- عدد الأجنة التي حصلت عليها : ....

أعمارها أو أطوارها : ....

٢- نوع المثبت المستخدم : ....

نوع الصبغة : ....

٣- عدد الشرائح التي تم عملها بواسطة المجموعة : ....

٤- اذكر باختصار خطوات دراسة الشكل الخارجي المبكرة في الفئران

....

....

....

٥- يقدم الطالب الشرائح التي تم عملها خلال هذا العملي كجزء من تقرير العملي.

٦- أرفق صور للأجنة التي تم صبغها.

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الخامس عشر

عمل الخصي لذكور الفئران
Vasectomy of Mice Male

الهدف

يتم عمل الخصي للذكور بعدة طرق، منها تدمير الخصية للذكور الصغيرة بوخزها بالأبرة أو الكماشة المسننة أو بقطع الوعاء الناقل لكل خصية في الذكر بعملية جراحية.

والهدف من عمل الخصي للذكور هوعمل التلقيح الكاذب للإناث ومعرفة الأنثى التي في دورة الشبق وتحفيز التبويض لديها وتهيئتها فسيولوجيا بشكل طبيعي لنقل الأجنة إليها.

وفي هذا العملي سوف يتم عمل الخصي لذكور الفئران بواسطة قطع الوعاء الناقل بالعملية الجراحية.

الأدوات والمواد (الشكل رقم ١٥،١)

- مادة مخدرة (كيتامدور ١٠٪ Ketamador).
- أدوات وطبق تشريح معقمة.
- خيوط جراحية معقمة.
- إيثر للتخدير. وكحول ٧٠٪ للتعقيم.
- آلة حلاقة أو موس لحلاقة الشعر.

طريقة العمل

١- يتم تخدير الذكر بحقنة بالمادة المخدرة (٠,٢ مل) بالحقن في عضل الرجل الخلفية.

٢- بعد أن يُخَدَّر الذكر يتم تنظيف الجهة البطنية بين الرجلين الخلفيتين.

٣- ثم يتم حلاقة الشعر بين الرجلين (الشكل رقم ١٥,١).

٤- بعدها يتم عمل قطع صغير (٠,٢ سم) بالمشرط بالجلد فوق منطقة الجهاز التناسلي بعرض البطن ثم يتم بالملقط سحب إحدى الخصيتين من كيس الصفن ويتم التعرف على الوعاء الناقل بالقرب من الخصية.

٥- ثم يتم عمل عقدة حول الوعاء الناقل بخيط الخياطة الداخلية ثم تعمل عقدة أخرى بالقرب من العقدة الأولى بحيث يتم تخليص المساريقا بين الوعاء الدموي عن الوعاء الناقل.

٦- ثم يقطع الوعاء الناقل بين العقدتين بحيث يتم التأكد بعدم قطع الوعاء الدموي الملاصق للوعاء الناقل (الشكل رقم ١٥,١).

٧- يتم إعادة أو ترجع الخصية إلى داخل كيس الصفن بالملقط بشكل دقيق.

٨- ثم يتم عمل نفس الطريقة مع الخصية الأخرى.

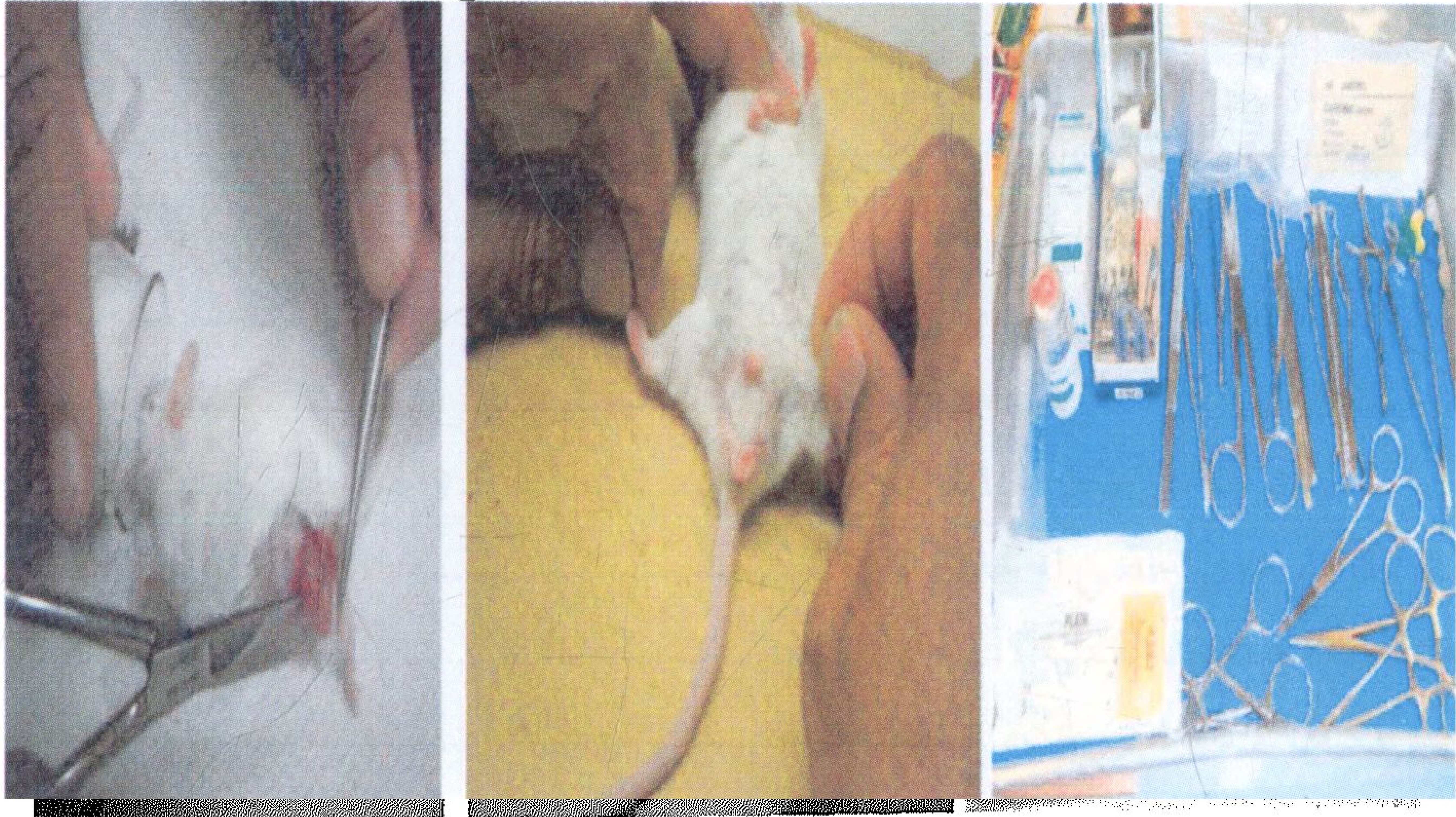
٩- بعدها يتم خياطة الغشاء الداخلي المغطي للأحشاء بخيط الخياطة الداخلي (Catgut).

١٠- ثم يتم بعدها خياطة الجلد مكان الجرح أو يمكن استخدام دباسة الخياطة (الشكل رقم ١٥,٢).

١١- يترك الذكر لمدة أسبوع ثم يزال الخيط الخارجي أو دبابيس الخياطة.

١٢- بعدها يمكن استعمال الذكر لعمل التلقيح الكاذب في الإناث المراد نقل الأجنة إليها بحيث تكون قد تهيأت فسيولوجيا بشكل طبيعي للحمل ونقل الأجنة إليها إما بعملية جراحية وإما بدون عن طريق القسطرة.

أ - ب - ج -



الشكل رقم (١٥,١). يوضح مراحل عملية الخصي لذكر الفأر بقطع الوعاء الناقل.

أ) الأدوات المستخدمة للعملية. ب) يخدر الذكر ثم يحلق الشعر. ج) قطع الجلد فوق منطقة الجهاز التناسلي يقطع الوعاء الناقل بين العقدتين.



الشكل رقم (١٥,٢). يوضح طرق الخياطة بعد العملية الجراحية للخصي إما بالخيط وإما بالتدبيس للجرح خارجيا.

تقرير العملي الخامس عشر:
عملية الخصي لذكور الفئران

الاسم: .... الرقم: ....

لماذا يتم عمل الخصي للذكور ؟...

ما المادة المستخدمة لتخدير الذكر وكم كميتها التي استخدمت؟..............................

ماحجم إبرة الخياطة التي استخدمت للخياطة الداخلية ؟...

وما سمك أو مقاس خيط الخياطة الداخلية ؟......................... والخارجية ؟.....................

كم ذكراً تم عمل الخصي له خلال التجربة ؟...

هل كلها فاقت بعد العملية ؟..

متى وكيف تم فك الخيوط؟..

هل تم استخدام الذكور والتأكد من عدم خصوبتها؟...

ما تقييمك لهذه التجربة من حيث الأداء والدقة وأهميتها ؟

....

....

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي السادس عشر

تجميد الحيوانات المنوية للفئران
Cryopreservation of Mice Sperm

الهدف

يهدف هذا الدرس العملي إلى تعلم كيفية حفظ الأمشاج المذكرة والأجنة بطريقة التجميد والحفظ بسائل النيتروجين.

الأدوات والأجهزة والمواد المستخدمة وطريقة العمل

أولاً: الأدوات المستخدمة

١- أدوات تشريح (ملقط، مقص، إبر تشريح).
٢- أطباق بتري بأحجام مختلفة وأنابيب دقيقة بغطاء.
٣- مرشحات (فلاتر) بأحجام مختلفة.
٤- مخبار مدرج ودوارق مختلفة الأحجام.
٥- قشات بلاستيكية حجمها ٠,٢٥مل (الشكل رقم ٢٠,١).
٦- ماصة أوتوماتيكية وإبر تشريح وصفيحة للتسخين.
٧- أوراق ترشيح أو مناديل ورقية مقواة.

ثانياً: الأجهزة المستخدمة

١- مجهر ضوئي مقلوب مزود بكاميرا وشريحة الهيموسيتوميتر.

٢- جهاز طرد مركزي بسرعة ١٠٠٠٠ لفة/ دقيقة.
٣- حضان درجة حرارته ٣٧° م مزود بهواء ٥٪ ثاني أكسيد الكربون.
٤- جهاز تبريد وتجميد السائل المنوي (الشكل رقم ١٦,١).
٥- حاوية غاز سائل النيتروجين (الشكل رقم ١٦,١).

ثالثاً: المواد المستخدمة

١- ماء مقطر.
٢- محلول الرفينوس من شركة سيجما. Rafinos from Sigma Comp.
٣- حليب منزوع الدسم.
٤- كحول لتعقيم مكان العمل.

رابعاً: خطوات العمل

١-تحضير البيئة

يذاب ١٨٪ من الرفينوس (Raffinose) و٣٪ من حليب منزوع الدسم في ١٠٠ مل من الماء المقطر عند درجة حرارة ٦٠°م.

ثم يتم عمل طرد مركزي للمحلول عند (٤٥٠٠ دورة في الدقيقة 4500 rpm in Beckman S W 28 rotor) لمدة عشرين دقيقة عند درجة ٢٢°م.

نفلتر المحلول ثم نضع منه ١٠٠ ميكرو لتر في طبق بتري صغير ونضيف عليه ١٥٠ ميكرو لتر من سكر الجلوكوز و ١٠٠ ميكرو ليتر من بيئة M2 وذلك لجمع الحيوانات المنوية فيه بواسطة أنبوبة سحب دقيقة، وفي أنابيب ذات غطاء كل واحدة تحتوي على ١٠٠-٢٠٠ ميكرو ليتر ثم نحفظها في الثلاجة عند درجة -٢٠° م تحت الصفر لحين استخدامه.

٢- طريقة جمع الحيوانات المنوية من الذكور Sperm collection

نقوم بقتل الذكور بواسطة التنخيع (فصل العمود الفقري عن الجمجمة ثم إزالة الجلد من حول منطقة الخصيتين (الشكل رقم ١٥,١)).

استخراج الخصية وإزالة الدهون والأغشية من حولها ثم قطع البربخ من طرفيه.

تستخرج الحيوانات المنوية من البربخ إما بوضع الوعاء الناقل في قطرة من البيئة (٢٠٠- ميكروليتر) ثم تنسيرة بالمقص أو الأبرة . أو بواسطة القيام بعصر البربخ بين الإصبعين (السبابة والإبهام)، ثم على رأس إبرة التشريح الدافئة يجمع المني الخارج من البربخ. ثم يوضع المني في طبق محلول التجميد ويترك المحلول لمدة ٥-١٠ دقائق في حضان درجة حرارته ٣٧ْم مزود بهواء و٥٪ ثاني أكسيد الكربون (لكي تنتشر الحيوانات المنوية).

٣- فحص وعد الحيوانات المنوية

يتم فحص وعد الحيوانات المنوية بواسطة شريحة العد Hemocytometer بنفس طريقة عد كريات الدم، أو جهاز تحليل السائل المنوي لعد الحيوانات المنوية (Semen Analyzer) كما في الشكل رقم (١٦,١) .

بعد أن نترك محلول الحيوانات المنوية في مكان دافئ لمدة ١٠ دقائق تقريبا .

نأخذ مقدار ٥٠ ميكرولتر من محلول الحيوانات المنوية بواسطة ماصة دقيقة Micropipette ثم نضيف هذا المحلول المحمل بالحيوانات المنوية إلى ٢٠٠ ميكرولتر من محلول الفورمالدهيد المنظم الحامضي ثم يقسم إلى أنبوبتين كل واحدة تحتوي على ٢٠٠ ميكرو ليتر.

طريقة عد الحيوانات المنوية اليدوي يكون كالتالي:

أ) وضع كمية من أحد الأنابيب (٢٥٠ ميكرون فورمالدهيد + ٥٠ ميكرولتر من محلول حيوانات منوية) على شريحة عد، ثم اختيار خمس مربعات لعد الحيوانات المنوية بواسطة جهاز العد.

ب) على الشريحة الأخرى نعمل نفس الشيء.

ج) نقسم على ٢ (تركيز المحلول) حمض الخليك الفورمالدهيد المنظم ٢٠٠ ميكرون.

د) نضرب بمعامل الضرب ١٠ × عدد المربعات (٥ مربعات).

أو يمكن استخدام جهاز تحليل السائل المنوي وذلك كالتالي :

توضع قطرة (٢٠,١٠ ميكرون) من محلول الحيوانات المنوية على الشريحة الخاصة لعد الحيوانات المنوية للفأر. ثم تحمل الشريحة على الجهاز لتفحص تحت المجهر. ثم يتم تشغيل البرنامج (انظر التعليمات مع كتيب الجهاز). سوف يعد الجهاز أربع مناطق ثم يحسب الكمية ونسبة الحركية وحتى قياس الحركية الفردية للحيوانات المنوية. كما يمكن استخدام الصبغة الخاصة لمعرفة نسبة الحي من الميت للعينة بواسطة جهاز تحليل السائل المنوي (الشكل رقم ١٦،١). منها يمكن تقدير كمية الحيوانات المنوية في المحلول، ثم يخفف محلول السائل المنوي حسب الحاجة.

٤- تعبئة المحلول في قشات بلاستيكية [٢٤]

تعبأ بواسطة أنبوبة السحب الدقيقة (الماصة الأوتوماتيكية) وتكون موصلة بالقشات وذلك لسحب ٥٠ ميكرو ليتر هواء أو فراغ ثم ٥٠ ميكروليتر سائل محلول الحيوانات المنوية ثم فراغ ٥٠ ميكروليتر مرة أخرى.

٥- إغلاق القشات البلاستيكية

يتم إغلاق طرفي القشات بواسطة الحرارة أو البودرة الخاصة بإغلاق القشات.

٦- طريقة التجميد

يعني بالتجميد خفض درجة حرارة محلول الحيوانات المنوية إلى اقل من درجة المني نفسه وذلك لحفظه لفترة طويلة . تركب القشات في حاوية جهاز التبريد والتجميد الالكتروني ثم يتم تشغيل البرنامج المناسب لتجميد الحيوانات المنوية الخاص بالجهاز ثم تترك العينة إلى نهاية البرنامج حتى تتجمد القشات تماما وفي حالة عدم توفر الجهاز الالكتروني الخاص بالتجميد يمكن عمل ذلك بترك محلول الحيوانات المنوية في درجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة تقريبا، ثم توضع بالثلاجة لمدة ٣٠ دقيقة ثم يتم تعريض القشات لبخار سائل النيتروجين بوضعها عند فوهة حاوية سائل النيتروجين

---

(٢٤) العيسى وآخرون (٢٠٠٩م).

لمدة ٥–١٠ دقائق حتى تكسيها البرودة تماما وحتى لا يتعرض إلى صدمة البرودة التي تؤدي إلى موت الحيوانات المنوية ثم تنزل تدريجيا في حاوية سائل النيتروجين.

٧– حفظ العينات Sample preservation

تحفظ العينات في حاوية سائل النيتروجين بعد وضع العلامات المناسبة وتاريخ الجمع بالنسبة لها على القشات.

٨– طريقة التسييح أو الإسالة (التدفئة) Thowing

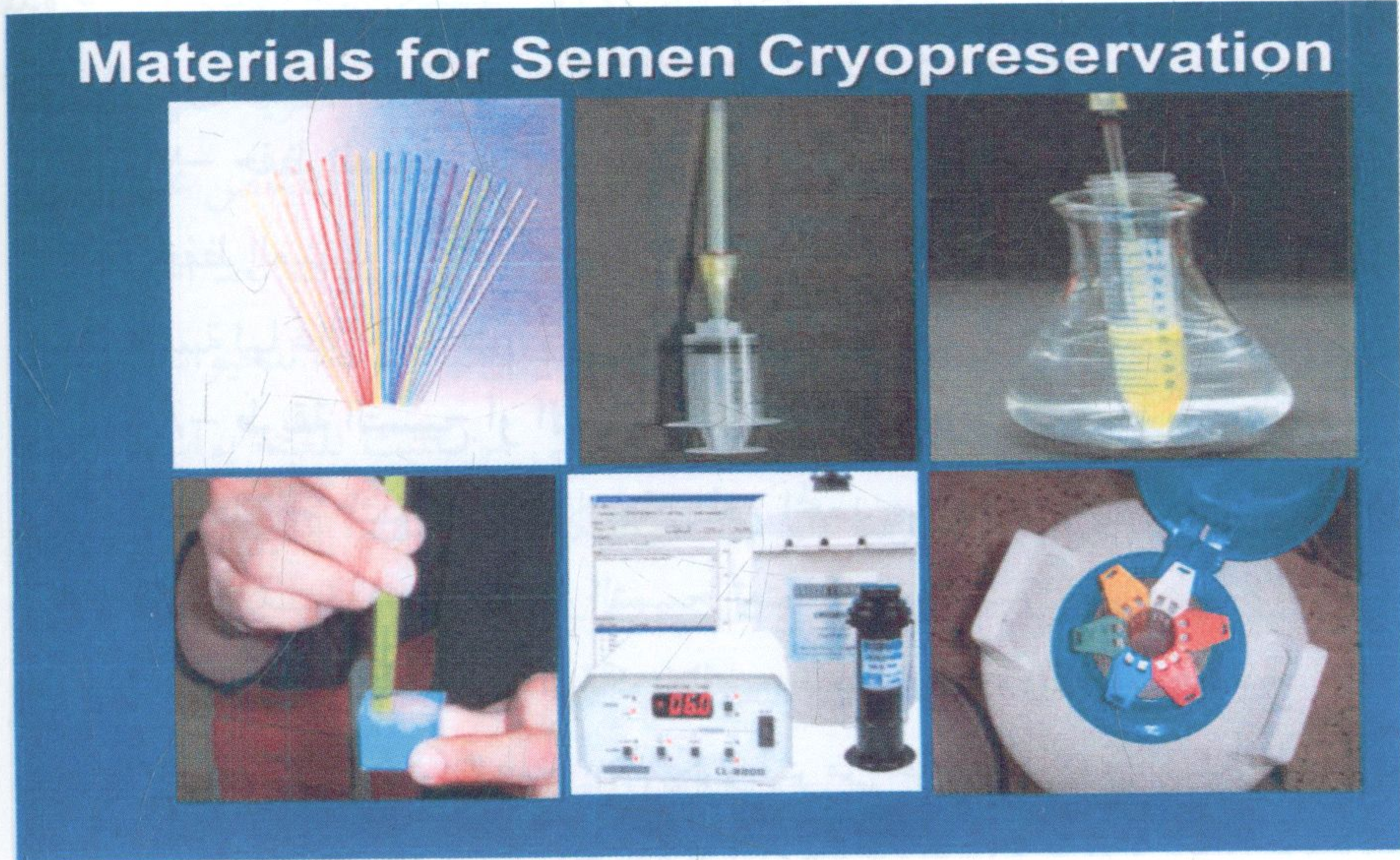
الإسالة أو التسييح تعني إرجاع المني المجمد من سائل النيتروجين إلى درجة حرارة ٣٧°م لاستخدامه، فطريقة التسييح تعتمد اعتمادا كبيرا على طريقة التجميد فإذا كان التجميد سريعا، وجب أن يكون التسييح سريعا أيضا والعكس صحيح.

القشات التي تحتوي على ٥٠ ميكرو ليتر من محلول المني يتم تسييح المني فيها عن طريق وضعها في حمام مائي بحرارة ٣٧ درجة مئوية مدة ٧ ثواني ف، ومن ثم تنقل إلى حمام مائي آخر بدرجة حرارة ٣٧° م لمدة لاتقل عن ٥ ثواني.

٩– طريقة إخراج السائل من القشات

تقطع القشات من أسفل (مكان الإغلاق) ويوضع طرفها المقطوع في طبق بتري دافئ (٣٧°م) ثم تقطع القشة من أعلى (جهة القطنة) حتى ينزل السائل الذي فيها أو يمكن إضافة كمية من البيئة (٠,٢ مل) لسائل القشات، كما يمكن استخدام الماصة الأوتوماتيكية في إنزال السائل من القشات ثم يفحص السائل لمعرفة حركية الحيوانات المنوية وتقديرها.

١ ٢ ٣



٤ ٥ ٦







الشكل رقم (١٦,١). المواد والاجهزة المستخدمة في حفظ وتجميد الأمشاج والأجنة بسائل النيتروجين (-١٩٦°م تحت الصفر).

١- يوضع السائل المنوي في حمام مائي. ٢- ثم يعبأ بالقشات باستخدام إبرة الحقن.

٣- ألوان مختلفة للقشات. ٤- حاوية سائل النيتروجي. ٥- جهاز التجميد الآلي.

٦- طريقة إغلاق القشات بالبودرة أو وضعها بأنبوبة ابندورف قبل وضعها بجهاز التجميد.

تقرير العملي السادس عشر:
تجميد الحيوانات المنوية للفئران

الاسم : .... الرقم : ....

١- كم عدد الذكور التي تم جمع الحيوانات المنوية منها؟...........................

٢- ما مكونات وكمية المحلول الذي جمعت فيه الحيوانات المنوية ؟

....

مكونات المحلول : ....

كمية المحلول : ....

٣- ما تركيز المحلول الذي جمعت فيه الحيوانات المنوية؟

....

٤- ما تركيز أو عدد الحيوانات المنوية؟ .... نسبة الحركية : ....٪.

....

٥- كم عدد القشات التي عملت لكل ذكر؟ : .... ومجموعها ....

٦- ما معدل التبريد المستخدم لتجميد الحيوانات المنوية؟...........................

٧- كم أخذ من الوقت حتى تم تجميد الحيوانات المنوية ووضعها في سائل النيتروجين؟ ....

٨- ماهو معدل التدفئة الذي تم استخراج الحيوانات المنوية من سائل النيتروجين؟ : ....

ما نسبة الحركية للحيوانات المنوية بعد التدفئة ؟..

١٠- ما هو تقييمك أو مدى استفادتك من التجربة؟ : منخفض .... متوسط .... عالي.

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي السابع عشر

استنساخ أجنة الأغنام
Sheep Embryo Cloning (٢٥)

الهدف

يهدف هذا العملي إلى التدرب على تقنية الاستنساخ بواسطة النقل النووي لأنوية خلايا جسدية ونقلها للبويضات لإنتاج أجنة مستنسخة في الحيوان (الأغنام).

مقدمة

تعتبر تقنية الاستنساخ من التقنيات الحديثة التي تساعد في إنتاج النباتات والحيوانات المعدلة وراثيا. كما تفيد تقنية النقل النووي والاستنساخ في تكاثر الحيوانات المرغوب بها بأعداد كبيرة وكذلك إعادة تكاثر الحيوانات المهددة بالانقراض أو المنقرضة وحماية الحياة القطرية، أو إنتاج حيوانات مقاومة للأمراض، كما تساهم التقنية حاليا بما يعرف بالاستنساخ العلاجي حيث يتم حقن خلايا جسدية في بويضات ثم تكوين أجنة في مرحلة التفلج حيث يمكن عمل خلايا جذعية من هذه الخلايا الجنينية ثم تحويل هذه الخلايا إلى خلايا عضلية أو عصبية أو بنكرياسية أو كبدية وغيرها لمعالجة الأمراض المختلفة.

---

(٢٥) Hosseini, *et.al* (2008).

الطريقة

أولاً: تجهيز الخلايا الجسدية Somatic cell preparation

يتم استخلاص خلايـا من منطقة جلد أذن أحـد الأغنام الصغيرة في السن عمـره ٣-٥ أشهر تقريبا بجلبها من الحيوانات التي تذبح بالمسلخ لتحويلها إلى خلايا جسدية حيث يتم تفكيك الخلايا بواسطة إنزيم التربسين ثم عمل الطرد المركزي وتكرير ذلك عدة مرات لتفكيك الخلايا ثم يتم غسل الخلايا وتنميتها في بيئة دليبيكو إيجل المطورة والمزودة بمصل دم العجل ١٠ ٪ Dulebeccos Modified Eagles Medium Supplemented with (FCS10%) وتمريرها (أي نقلها من طبق إلى طبق) عدة مرات كل يومين في أطباق بتري للتكاثر بوضعها في الحضان درجة حرارته ٣٩°م مزود بثاني أكسيد الكربون بنسبة ٥٪ وهواء ورطوبة نسبية (5% CO_2 in air with relative humidity).

يتم تمرير الخلايا الجسدية لأكثر من ٧ مرات تقريبا ثم تنمية مجموعة منها في بيئة محدودة العناصر الغذائية لكي تدخل فترة الكمون من دورة الخلية (G0) منخفضة في مصل أو سيرم دم العجل (FCS 0.5 %)، لكي يمكن أن يتم دمجها في البويضات.

ثانياً: جمع البويضات من مبايض الأغنام

يتم جمع المبايض من الأغنام التي تذبح في مسلخ المدينة في الصباح ثم تنقل في أطباق تحتوي على محلول فسيولوجي متعادل (PBS) دافئ، ثم في المعمل يتم استخراج وجمع البويضات من مبايض الأغنام بواسطة الشفط بالإبرة ثم غسلها ثم تنميتها في بيئة إنضاج البويضات (*In vitro* maturation medium IVM) (انظر الجدول رقم ١٧,١)، وهي تشمل بيئة زراعة الأنسجة أو الخلايا (رقم ١٩٩ -TCM من شركة سيجما) مزودة ببعض المكونات.

الجدول رقم (١٧,١). يوضح مكونات بيئة إنضاج البويضات *In vitro* maturation medium (IVM).

Ingredients	Volume
TCM 199 (Earle`s salts)	9 ml
FBS (10%)	1 ml
Gentamycin Solution (10mg / ml)	25 µl
FSH (2 AU/ml) LH(5-10 IU/ml)	100µl
E2 (1 ug/ml)	10µl
Pyruvate Stock Solution (2.2 mg / ml)	100µl

ثالثاً: التخلص من أنوية البويضات ودمج الخلايا الجسدية بالبويضات

ثم في اليوم التالي وبعد ٢٢ ساعة من فترة الإنضاج يتم التخلص من الخلايا الحويصلية من حول البويضات بواسطة تمريرها في بيئة تحتوي علـى إنزيم الهالورنديز لمدة ٣-٥°م والشفط بأنبوبة دقيقة (الشكل رقم (١٧,١).

وللتخلص من أنوية البويضات يتم ترقيق غشاء البويضة الشفاف بواسطة تمريرها بمحلول يحتوي على سيتوكالسين بي لمدة ٣ دقائق (5ug/ml cytochalsin B) ثم يتم التخلص من انوية البويضات تحت المجهر التشريحي للمعالجات فائقة الدقة (Micromanipulator) حيث يتم عمل قطع في الغشاء الشفاف للبويضة وتمرير أنبوبة القطع الدقيقة (Cutting micropipette) تحت الجسم القطبي الأول للبويضة ثم دفع البويضة أعلى أنبوبة القطع بأنبوبة الحمل الدقيقة (Holding) حتى ينقطع الغشاء الشفاف كما في الشكل رقم (١٧,٢).

ولإخراج نواة البويضة يتم عصر البويضة بواسطة الضغط على منتصفها بنفس أنبوبة القطع الدقيقة فتخرج نواة البويضة والجسم القطبي، والتي يتم فصلها عن البويضة بواسطة أنبوبة الشفط وتوضع في قطرة بيئة فيها صبغة هوتش فلورسنتية (Hoechst stain) لفحصها للتأكد من خروج أنوية البويضات يفضل فحص الأنوية المزالة تحت المجهر الفلورسنتي.

رابعاً: النقل النووي (Nuclear Transfer)

لعمل الاستنساخ فإنه يتم دمج الخلايا الجسدية (الكامنة G0) تحت مجهر المعالجات الدقيقة (Micromanipulator) حيث يتم نقل الخلايا الجسدية بواسطة أنبوبة الحقن الدقيق وذلك بحقن خلية واحدة تحت الغشاء الشفاف لكل بويضة (الشكل رقم ١٧,٣.).

خامساً: الدمج الخلوي Cell fusion

يتم نقل البويضات التي تم نقل الخلايا الجسدية لها إلى بيئة دمج الخلايا (Fusion medium) في الطبق (انظر الجدول رقم ١٧,٢)، ثم يتم دمج الخلايا الجسدية بالبويضة بواسطة جهاز الدمج الخلوي بواسطة قطبي تيار كهربائي بشدة ٢,٧٢ فولت/ سم لمدة ١١ ثانية باستخدام جهاز (Electro Cell Manipulator pulses 2.72 kV/cm for 11 usec) (الشكل رقم ١٧,٤).

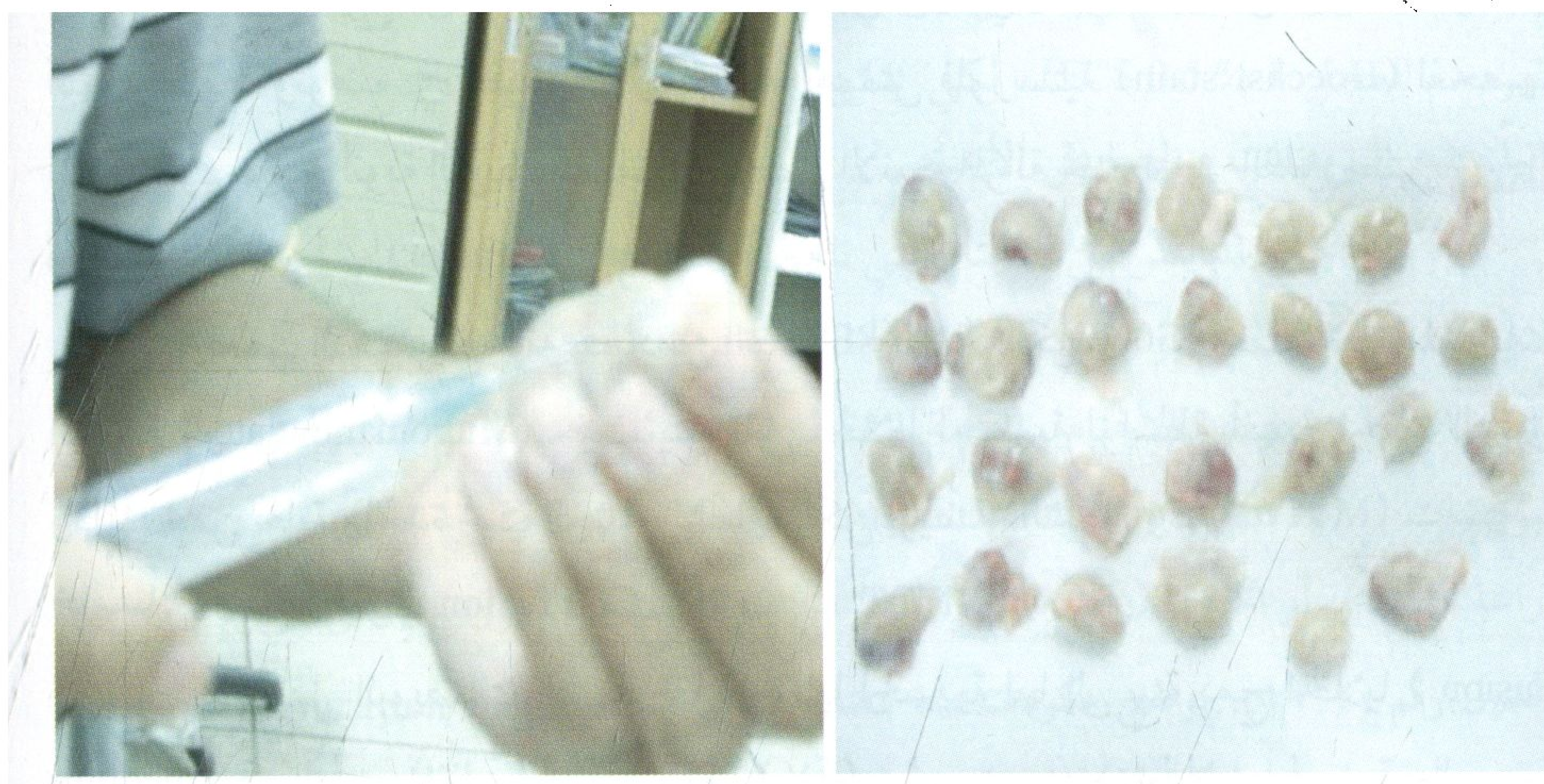
بعدها يتم تنشيط البويضات المدمجة بالخلايا الجسدية بواسطة تمريرها في بيئة الأينوميسين (5uM Ionomycin) ثم يتم معاملة الخلايا في بيئة تنشيط الخلايا (هي بيئة قناة

البيض المحضرة (synthetic oviduct fluid medium without KH_2 PO_4 (mSOF) (10 ug./ml لمدة ٦ ساعات في الحضان درجة ٣٩°م مزود بثاني أكسيد الكربون ٥٪ والهواء ورطوبة نسبية عالية.

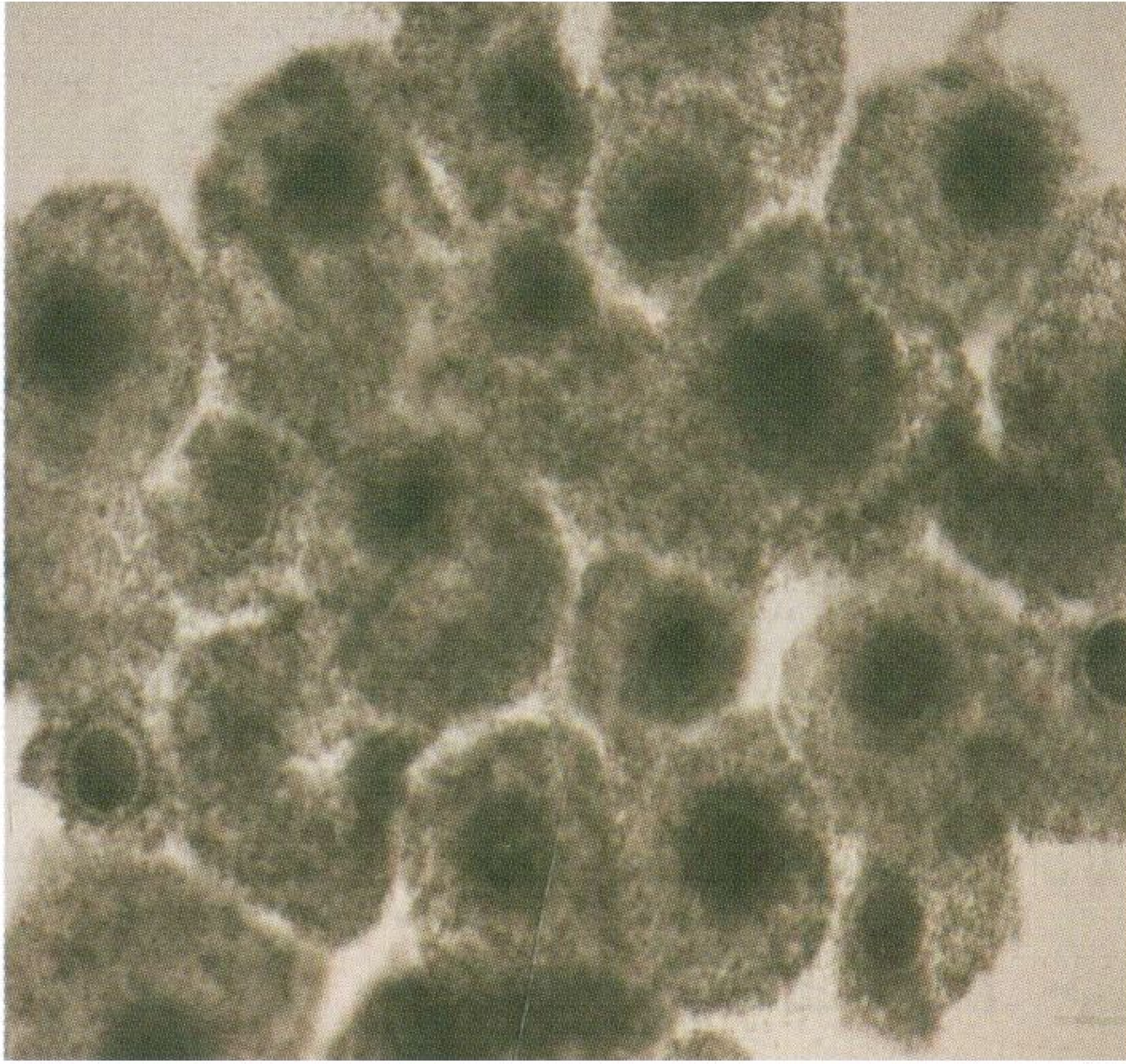
سادساً: تنمية البويضات المستنسخة

بعد التنشيط الخلوي يتم تنمية البويضات المدمجة معهما الخلايا الجسدية في بيئة تنمية الأجنة (mSOF) ويتم تغطية قطرات البيئة في الطبق بزيت البرافين وتوضع لمدة ٤٨ ساعة في الحضان (٣٩°م + ٥٪ ثاني أكسيد الكربون + ٩٠٪ نيتروجين + ٥٪ أكسجين) حيث توضع في حاوية حاضنة خاصة للحفاظ على الظروف البيئة المناسبة.

بعد يومين يتم متابعة نمو الأجنة فالأجنة التي نمت ووصلت إلى طور ٤-٨ خلايا هي الأجنة المستنسخة والتي فيما بعد يتم تنميتها إلى طور المفلجة بعد أسبوع من الاستنساخ. ثم نقلها إلى إناث مستقبلة ومهيأة فسيولوجيا للحمل (٢-٣ أجنة لكل نعجة) ثم يتم متابعة الإناث الحوامل لحين الولادة حيث تكون هي المواليد المستنسخة.



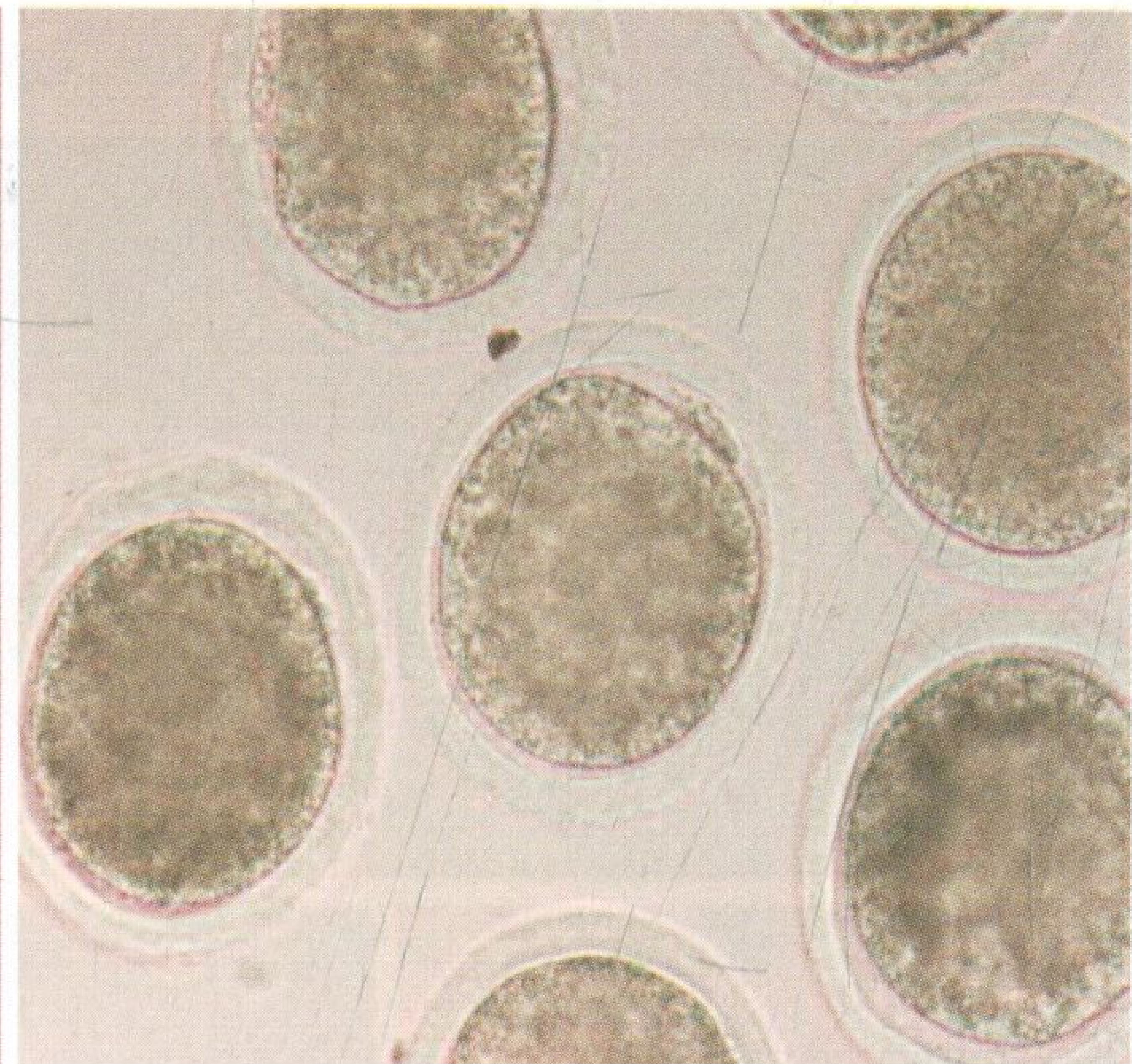
الشكل رقم (١٧,١). يوضح جمع البويضات من مبايض الأغنام.





البويضات قبل الإنضاج (لاحظ الخلايا الحويصلية المحيطة بها) البويضات بعد الإنضاج وتمدد الخلايا الحويصلَية.

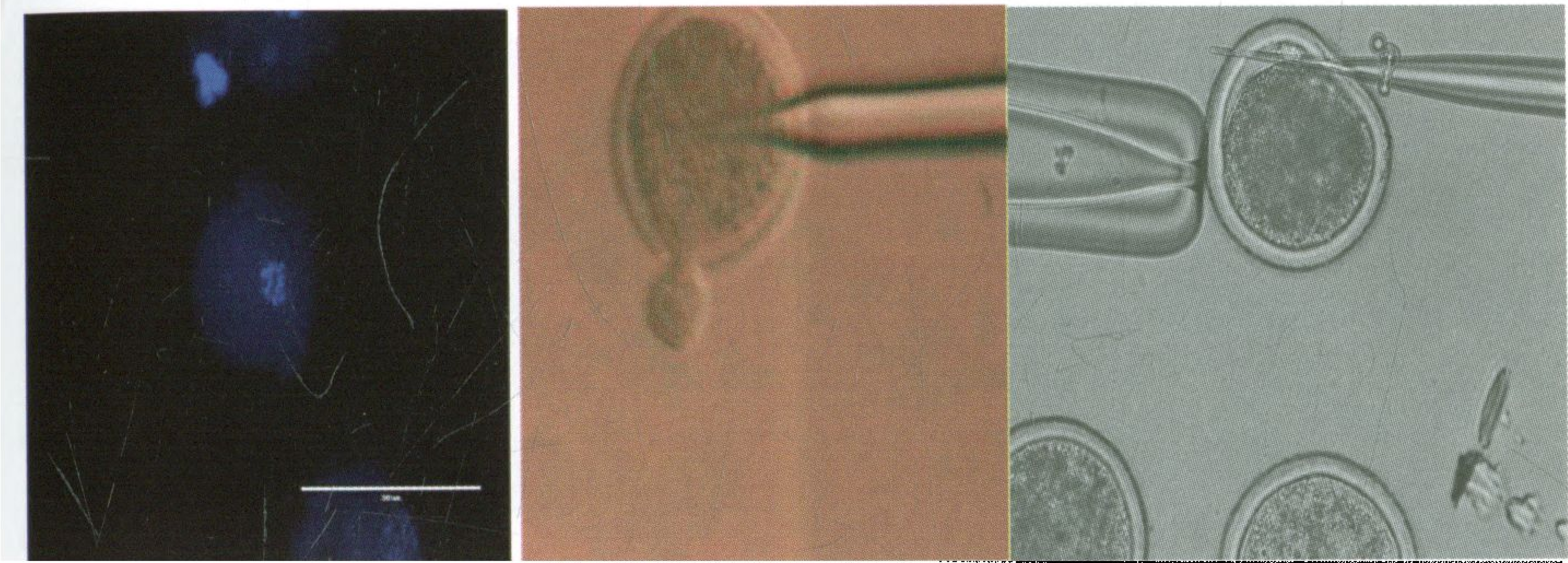




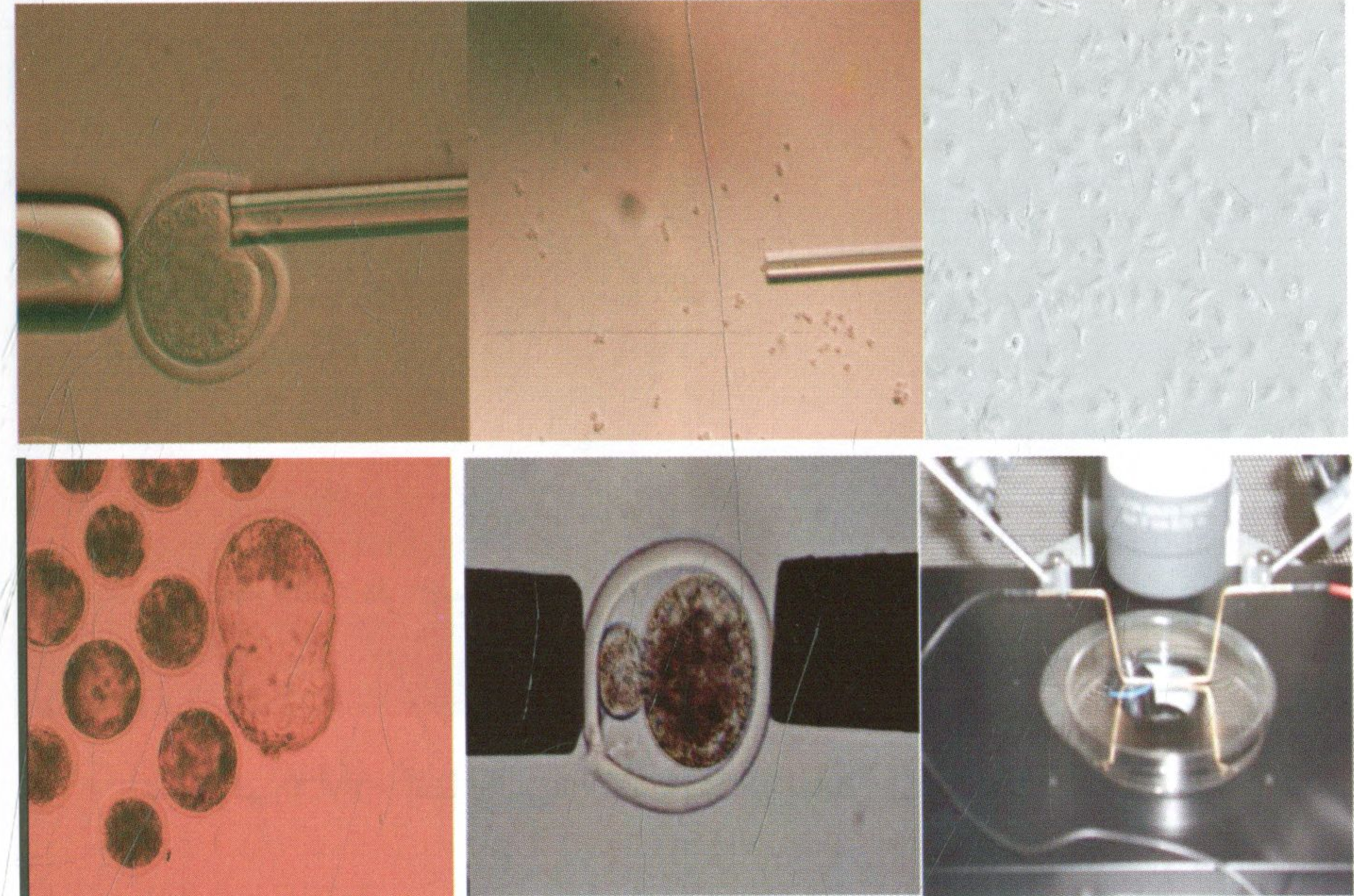
البويضات الناضجة تحتوى على الجسم القطبي.

ويتم صبغ بويضة للتاكد من نضوج البويضات (نوية البويضه في الطور الاستوائي الثاني للانقسام الاختزالي).

الشكل رقم (١٧,٢). إنضاج البويضات المجموعة من المبايض في بيئة إنضاج لمدة ٢٤ ساعة.



الشكل رقم (١٧,٣). يوضح طريقة التخلص من أنوية البويضات باستخدام المجهر التشريحي للمعالجات الدقيقة (Micromanipulator). حيث يتم التخلص من أنوية البويضات بعمل قطع فوق منطقة الجسم القطبي للبويضة ثم الضغط على البويضة لكي تخرج النواة والجسم القطبي ثم يتم صبغ النويات المزالة وفحصها تحت المجهر الفلورسنتي للتأكد من إزالتها من البويضة.



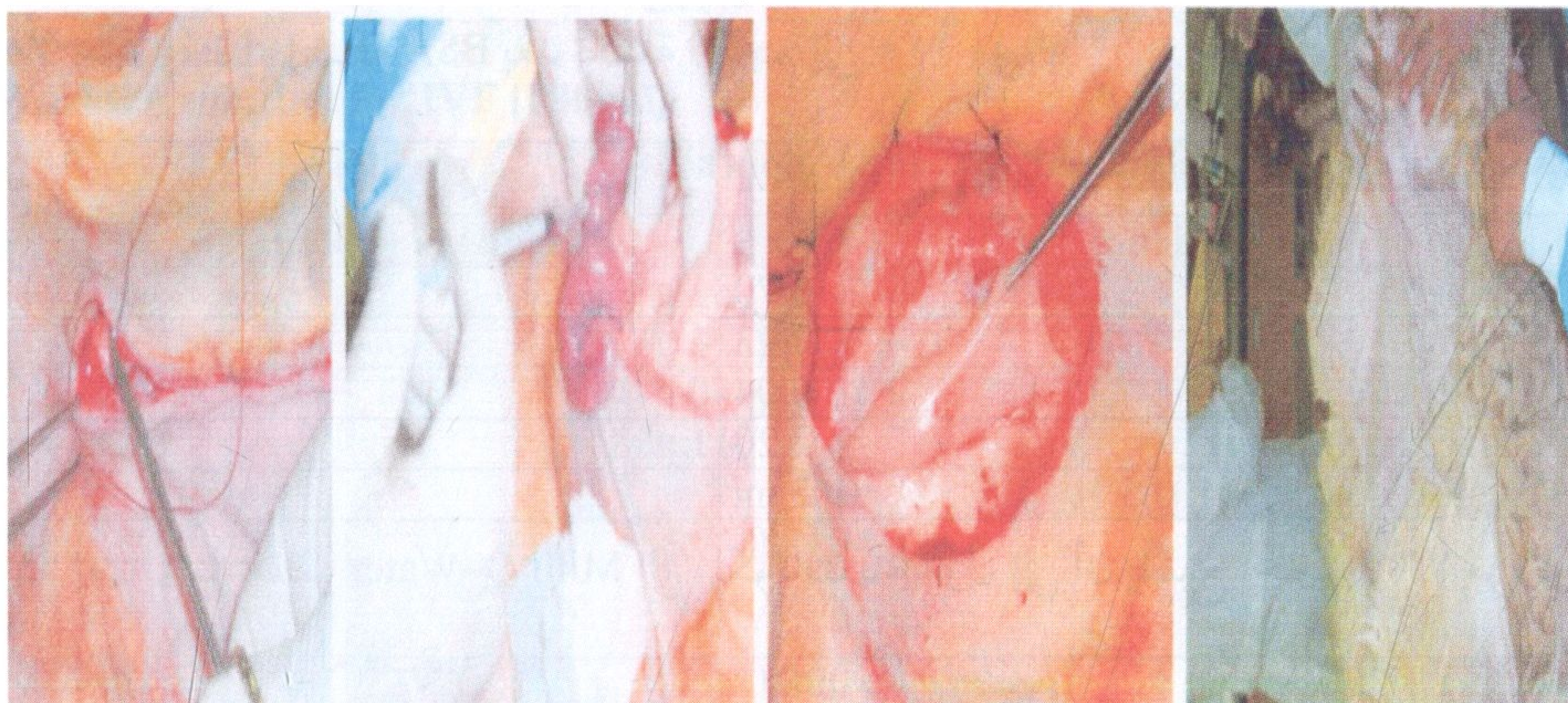
الشكل رقم (١٧,٤). يوضح طريقة دمج الخلايا الجسدية مع البويضات. وذلك بوضع خلية جسدية واحدة تحت الغشاء الشفاف لكل بويضة ثم تحت المجهر الدقيق يتم دمج الخلية الجسدية بالبويضة بواسطة جهاز الدمج الخلوي،ثم تنمية البويضات لمدة ٥-٧ ايام وتكوين اجنة مستنسخة في طور البلاستولة او المفلجة.

سابعاً: نقل الأجنة المستنسخة

بعد نمو الأجنة إلى طور المفلجة يمكن نقلها إلى أنثى مهيأة فسيولوجيا عن طريق أولا حقنها قبل ٣ أسابع من التجربة بهرمون البروستا جلاندين (Prostaglandin) (للتخلص الحمل سابق أو من الجسم الاصفر في المبيض) ثم بعد أسبوع يتم وضع أسفنجة في مهبل الأنثى قبل نقل الأجنة بأسبوعين لتنظيم الدورة التناسلية فيها.

ثم تحقن الأنثى بالهرمون التناسلي لتنشيط المبايض فيها قبل يومين من نقل الأجنة إليها ثم يمكن نقل الأجنة بعملية جراحية بالنسبة للأغنام كما في الشكل رقم (١٧,٥)، أو بدون عملية جراحية عن طريقة القسطرة.

حلاقة الصوف ثم فتح البطن ثم حقن الأجنة في قرن الرحم، ثم خياطة الجرح.



الشكل رقم (١٧,٥). مراحل نقل الأجنة في الأغنام بعملية جراحية.

الجدول رقم (١٧,٢) يوضح مختلف البيئات الخاصة بمعالجة بويضات الأغنام لعملية الأستنساخ.

بيئة زراعة الخلايا CULTURE MEDIA

يتم إضافة ماء مقطر بجهاز التقطير Milli Q – Water إلى المكونات بالجدول إلى أن يصبح الحجم ١٠٠ مل

10x Synthetic oviductal fluid SOF (stock solution) store in 4° C for 1month

Ingredients	Weight for 200 ml	Weight for 100 ml
NaCl	12.5880 g	6.2940 g
KCl	1.068 g	0.5340 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.5028 g	0.3300 g
$MgCl_2.6H_2O$	0.1992 g	0.100 g
Phenol red	Few	0.010 g

Working SOF Solution=100 ml

Ingredients	Weight
10x SOF medium	10 ml
Na pyruvate	0.0036 g
$NaHCO_3$	0.2106 g
Glucose	0.0270 g
L-Glutamine	0.0146 g
Na – Lactate (معلق)	47 µl
MEM Non- essential amino acid(100x)	1 ml
MEM essential amino acid(50x)	2 ml
BSA	0.30 g
Gentamycin Solution	250 µl

يتم إضافة ماء مقطر بواسطة جهاز Milli Q – Water إلى المكونات بالجدول إلى أن يصبح الحجم ١٠٠ مل.

ملاحظة: يفضل إضافة BSA بعد تكملة الحجم إلى ١٠٠ مل.

CR1aa

Stock solution A = (760 ml, 4°C for I month)

Ingredients	Weight for 200 ml
NaCl	6.7031 g
KCl	0.2311 g
Na-Pyruvate	0.0440 g
$NaHCO_3$	2.2011 g
Phenol red solution 0.5 %	2 ml

يتم إضافة ماء مقطر Milli Q–Water إلى المكونات بالجدول إلى أن يصبح الحجم ٧٦٠ مل ثم يمزج جيدا ويعمل له فلترة.

Stock solution B = (200 ml, 4°C for I month).

١ - Lactic acid hemicalcium salt = 0.5996 g (from sigma L2000).

٢ - يتم إضافة ماء مقطر Milli Q – Water إلى المكونات إلى أن يصبح الحجم ٢٠٠ مل ثم يمزج جيدا ويعمل له فلترة.

Working solution CR1aa with 5% FBS = 50 ml

Ingredients	Weight
Stock solution A	38 ml
Stock solution B	10ml
MEM Non- essential amino acid (100x)	0.5 ml
BME essential amino acid(50x)	1 ml
L-Glutamic acid	0.5 ml
BSA (fatty acid free, sigma A7030)	0.15 g
Gentamycin Solution	125 µl
FBS	2.63 ml

كيف نحضر L-Glutamic acid

10 ml Milli Q Water + 20 mg Glutamic acid (Sigma G8415).

بيئة الإخصاب الاصطناعي الخارجي *In vitro* fertilization medium IVF

10 x B.O medium = Stock IVF media solution (100 ml, 4°C, 1 month)

Ingredients	Weight for 200 ml	Weight for 100 ml
NaCl	13.1 g	6.5500 g
KCl	0.6 g	0.300 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.66 g	0.3300 g
$MgCl_2.6H_2O$	0.2 g	0.100 g
Phenol red	Few	0.0100 g
Sodium dihydrogenphosphate dihydrate (NaH2PO4.H2O)	0.258 g	0.1290 g

يتم إضافة Milli Q – Water إلى المكونات بالجدول إلى أن يصبح الحجم ١٠٠ مل.

Working solution for IVF (100 ml)

Ingredients	weight
10x BO medium	10 ml
Milli Q – Water	90 ml
Na-pyruvate	0.0138 g
$NaHCO_3$	0.3104 g
BSA	0.300 g

تقرير العملي السابع عشر:
استنساخ أجنة الأغنام

اسم الطالب : .... رقم الطالب : ....

نوع البيئة الخاصة بزراعة الخلايا الجسدية كانت؟ ....

كم عدد المبايض التي تم جمعها من المسلخ؟ ....

كم مجموع عدد البويضات المستخلصة؟ .... معدل كل بيضة=.....................

عدد البويضات التي تم نضوجها .... كيفية التعرف عليها.............

عدد البويضات التي تم استخراج أنويتها بشكل سليم؟ ....

نوع الخلايا الجسدية المستخدمة في الاستنساخ من أين أخذت؟ ....

كم بويضة تم نقل الخلايا الجسدية إليها؟ ....

مانوع البيئة المستخدمة في الدمج الخلوي؟...

كيف تم تنشيط البويضات بعد دمجها بالخلايا الجسدية؟ ....

مالفرق بين بيئة الإنضاج وبيئة تنمية البويضات؟

....

....

هل تم وضع الأجنة عند تنميتها في حاضنة خاصة (Incubating Chamber) وما أهميتها وكيف تم عمل ذلك؟...

....

....

كم عدد الأجنة التي نمت والأطوار التي وصلت إليها؟...

طور الخليتين .... طور الأربع خلايا .... طور ثمان خلايا ....

طور التوتية .... طول البلاستيولة.............................

هل تم تجميد أو نقل الأجنة المتكونة؟ ....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الثامن عشر

زراعة الخلايا الليفية و السرطانية
Fibroblast and Cancer Cells Culture

الهدف

يهدف هذا العملي إلى التدرب على زراعة الخلايا الليفية أو الجسدية سواء خلايا الدم أو الجلد أو الخلايا السرطانية لعمل خطوط من المزارع الخلوية Cell lines [٢٦]. وتكمن أهمية زراعة الخلايا الجسدية في أنها يمكن أن تستخدام إما لتجربة الاستنساخ أو لدمج الخلايا الجسدية بالأجنة أو لدراسة تأثير بعض العقاقير على الخلايا السرطانية وغيرها.

المواد والأجهزة المستخدمة في التجربة

- أطباق بتري أو دوارق مسطحة لزراعة الخلايا.
- أنابيب ماصة إبندورف ١٠ ، ٥ مل وماصات دقيقة.
- بيئة إيجل لزراعة الخلايا (Dulbecco's Modified Eagles Medium DMEM) (or RPMI medium).
- أنزيم التربسين ٢٥٪ Trypsin enzyme
- سيرم أو مصل دم العجل أو أليبومين سيرم الدم البقري: Fetal Calf Serum FCS .or Bovine Serum Albumin BSA
- حضان + معقم للبيئات والأدوات Autoclave and Incubator.
- كابينة زراعة خلايا Cell culture hood.
- جهاز طرد مركزي (Centrifuge).

---

(٢٦) Paul (1975).

طريقة زراعة الخلايا الليفية أو السرطانية للفأر Fibroplast or Cancer cells Culture in Mouse

١- يتم تحضير البيئة الخاصة بزراعة الخلايا مثل بيئة إيجل المطورة (Dulcbeccos Modified Eagles Meduim DMEM bovinc serum) إما تكون جاهزة الصنع أو بودرة. يتم تعقيم البيئة إما بفلتر ترشيح أو إذا تم تحضيرها من البودرة جاهزة الصنع فإنها تعقم في جهاز التعقيم ثم في يوم زراعة الخلايا يُضاف لها سيرم دم العجل أو الألبيومين البقري تركيزة ١٠٪ (DMEM + (10%FBS) fetal bovine serum).

٢- يتم تشريح أحد الفئران والحصول على الخلايا الجسدية إما من خلايا الدم أو قطعة من نسيج الجلد أو غيره أو إذا كان الفأر فيه ورم يمكن تشريح منطقة الورم واستخلاص قطعة من النسيج الورمي (الشكل رقم ١٨،١).

٣- يتم تفكيك النسيج بواسطة تقطيعه إلى قطع صغيرة جدا ثم تنسيرها بإبرة التشريح للتفكيك الأولي لخلايا النسيج.

٤- ثم يوضع على مستخلص النسيج أو الخلايا إنزيم التربسين (تركيزة ٢٥٪) مع البيئة وفيها ١٠٪ سيرم دم البقر في بيئة إيجل (DMEM +10%FBS) لمدة ١٠-١٥ دقيقة في الحضان درجة حرارته ٣٧مْ.

٥- بعدها تجمع خلايا النسيج في أنبوبة إبندورف ٥-١٠مل ذلك لكي يتم عمل الطرد المركزي لمستخلص الخلايا بعد وضعها في أنبوبة لمدة ١٠ دقائق ١٥٠٠د/د في درجة حرارة الغرفة، إذا لم تتفكك الخلايا يكرر ذلك عدة مرات حتى يتم تفكيكها.

٦- بعد تفكك الخلايا ثم يتم غسل الخلايا وتنميتها في طبق بتري أو دورق زراعة الخلايا (الشكل رقم ١٨،٢) يحتوي بيئة دليبيكو إيجل المطورة والمزودة بسيرم دم العجل ١٠٪ (DMEM+10%BSA or10% FCS) ثم توضع في الحضان درجة حرارته ٣٧ْم مزود بثاني أكسيد الكربون بنسبة ٥٪ وهواء 95% ورطوبة نسبية عالية (5% CO_2 in air with relative humidity).

٧- بعد يومين من زراعة الخلايا تكرر عملية التفكيك للخلايا بواسطة إنزيم التربسين ثم عمل الطرد المركزي.

٨- بعد تفكيك الخلايا يحسب تركيز الخلايا في بيئة زراعة الخلايا بواسطة أخذ عينة من مزرعة الخلايا (١٠ ميكرولتر) ثم يتم حساب تركيزها إما بواسطة جهاز عد الخلايا

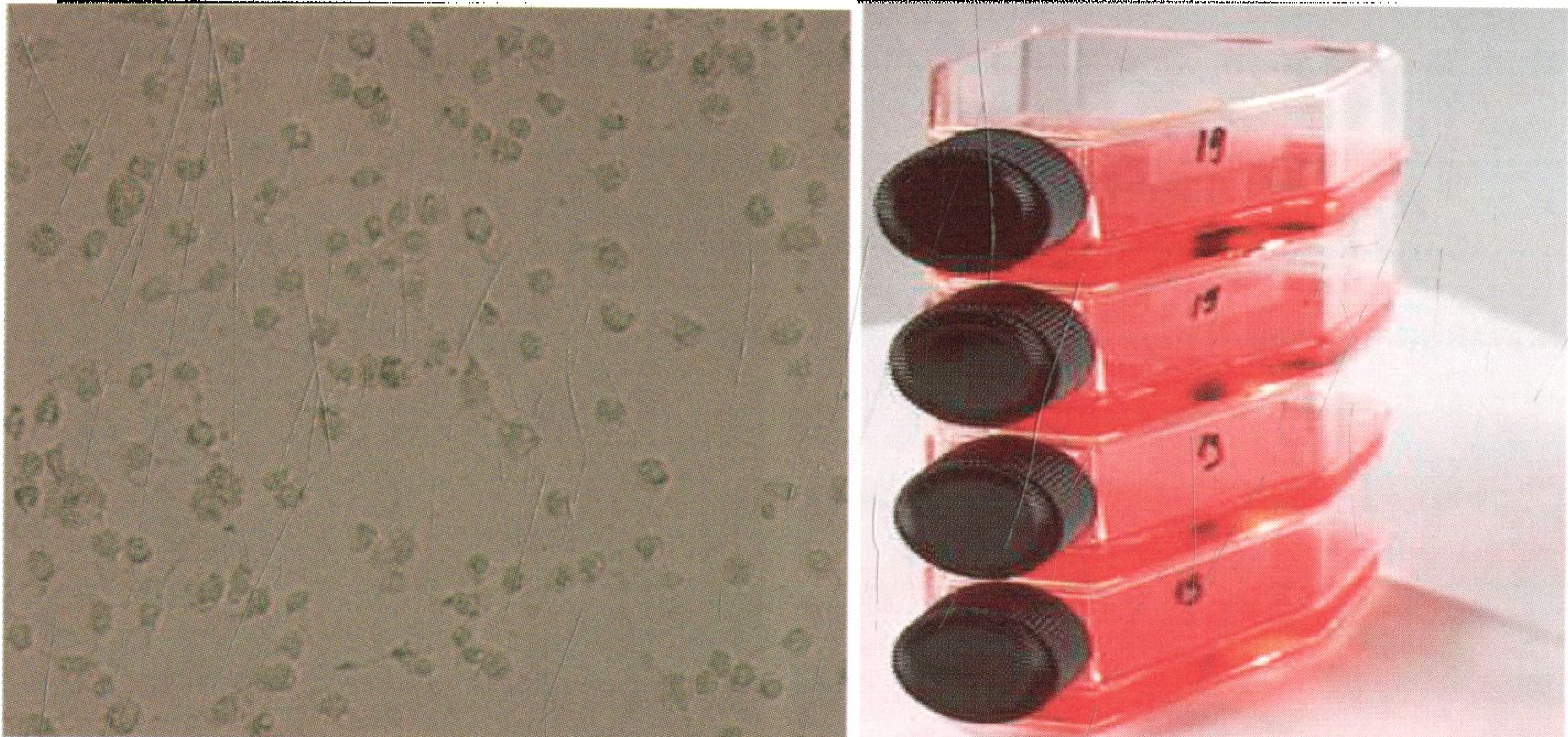
أو بواسطة شريحة العد الزجاجية التي يتم فيها عد الخلايا الدموية (Hemocytometer) إذا كان هناك تجمع للخلايا بشكل غير طبيعي تعالج بيئة الخلايا بمادة الميتوميسين س لمدة ساعتين.

٩- ثم يتم زراعة الخلايا مرة أخرى في أطباق جديدة أخرى.

١٠- بعدها يتم تمرير الخلايا Cell Passage (أي نقلها من طبق إلى طبق) عدة مرات كل يومين في أطباق بتري التي تحتوي على بيئة زراعة الخلايا للتكاثر بوضعها في الحضان درجة حرارته ٣٧°م مزود بثاني أكسيد الكربون بنسبة ٥٪ وهواء ٩٥٪ ورطوبة نسبية (٥٪ CO_2 in air with relative humidity).



الشكل رقم (١٨,١). صورة لفأر فيه ورم تم استخلاص قطع من نسيج الورم منه لزراعتها.



الشكل رقم (١٨,٢). صورة لدوارق زراعة الخلايا وصورة لخلايا بعد تفكيكها وزراعتها في الطبق للفأر.

تقرير العملي الثامن عشر
زراعة الخلايا الليفية أو السرطانية

اسم الطالب : .... رقم الطالب : ....

١ - ما نوع النسيج الذي استخدمته في زاراعة الخلايا في هذا العلمي؟................................

....

٢- ماهو نوع البيئة التي استخدمت في زراعة الخلايا؟..

٣- كم كان عدد أو تركيز الخلايا للزراعة المستخدمة؟..

٤- هل كان هناك تلوث لبيئة زراعة الخلايا؟ لا .... أو نعم ....

إذا كان هناك تلوث حدد أين حصلت أو حدثت مرحلة التلوث :

....

٥- كيف يمكن تجنب التلوث في بيئات زراعة الخلايا؟

....

....

....

لخص خطوات زراعة الخلايا الجسدية على شكل نقاط :

....

....

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي التاسع عشر

تكوين الخلايا الجذعية وزراعتها في الفأر
Establishment and Culture of Stem Cells of Mice

الهدف

يهدف هذا الدرس العملي إلى التدرب على إنتاج الخلايا الجذعية الجنينية وكيفية استخلاصها ثم الخطوات الواجب إتباعها لتاسيسها وزراعتها(٢٧).

المواد والأدوات المستخدمة

- إناث فئران في مراحل حمل مبكرة (مرحلة المفلجة أو البلاستولا).
- بيئات زراعة الخلايا الجذعية (Embryo stem cell culture medium ES (DMEM)).
- مضاد سيرم الفأر من الأرنب (Rabbit-anti –mouse-spleen serum).
- إنزيم البرونيز في محلول الفسفات متعادل (0.5 % pronase in PBS).
- إنزيم التربسين مع محلول إيدتا في محلول فسيولوجي (.25% Trypsin in 0.04 Ethyl dimethyl tetra acetic (EDTA) in PBS).

- Knockout (DMEM) Dulbecco s modified Eagle s medium (GIBICO) Catt no. 10829 -018 (ES- GRO)(Invertogen)
+ 4.5 g/l. D Glu
+ Sodium Pyruvate
- L- Glutamine

---

(٢٧) الحميدي والكريم (١٤٢٨هـ).

Gibco Cat no. 25300-054
- Leucocyte inhibiting factor LIF ($10X10^7$ uints/100ul)
from Chemo Com. (4C)
-Adjuvent complete freunt from DIFCO code no.0638
-Glelatin from Procrine skin type A Sigma Cat. No. G.1890 100 gm.
-Mercaptoethanol
Non –essential amino acid

مواد التجميد:

محلول بيئة حفظ بالتجميد
From Mitsubishi Kagaku Yatoron.((500ul/100mm dish $1x10^7$cell).
حاوية لتجميد الخلايا. Cell Banker

تحضير بيئة الخلايا الجذعية الجنينية Preparation of Embryo Stem ES Cell Culture Medium

بيئة تنمية الخلايا الجذعية الجنينية تحضر من الآتي:

(١٠٠مل) من شركة GIBICO) (ES- GRO) (Invertogen).
- 80 ml of Knockout DMEM (Dulbecco's modified Eagle s medium(GIBCO)
- 2ul L-Glutamine Solution (-30C)
- 20 ul knockout Serum replacement SR(-30C)
-182 ul 2-mercaptoethanol
-1 ml Non –essential amino acid
-500ul Sodium Pyruvate
-FLITTER
-Add LIF Leucocyte inhibiting factor ($10X10^7$ uints/100ul) from Chemo Com. (4C).

طريقة إنتاج الخلايا الجذعية الجنينية (الطريقة المناعية): Immunosurgery of Mouse Blastocyst

١- يتم استخراج الأجنة من الأنثى في طور المفلجة (٣,٥ أيام) بعد التلقيح بالنسبة للفأر في محلول بيئة (DMEM) وتحت المجهر التشريحي يتم عمل الخطوات التالية: أما إذا كانت المفلجة قد بزغت أو تمزق الغشاء الشفاف من حولها تنقل الأجنة إلى الخطوة رقم (٥).

٢- يتم تحضير طبق فيه ١١ قطره مغطاة بزيت البرافين (انظر الشكل رقم ١٩,١).

٣- توضع الأجنة (١٠ أجنة لكل طبق) في أول قطرة فيها محلول الفوسفات الفسيولوجي يحتوى على إنزيم البرونيز (٠,٥٪)(0.5 % Pronase in PBS) لمدة دقيقة واحدة حتى يتم التخلص من الغشاء الشفاف حول المفلجة.

٤- ثم تغسل مرتين في محلول بيئة تنمية الخلايا الجذعية (ES cell culture medium).

٥- توضع الأجنة بعد ذلك في محلول مضاد للسيرم (Rabbit-anti –mouse-spleen serum) في الحضان لمدة ٣٠دقيقة لتحرير خلايا النسيج الغذائي.

٦- تغسل الأجنة في محلول بيئة لمدة ثلاث مرات (تمرر في ٣ قطرات).

٧- توضع الأجنة في قطرة بيئة بها محلول مكمل للمضاد السيرم (Complement dilution of Rabbit-anti –mouse-spleen serum). لمدة ٣٠ دقيقة في الحضان

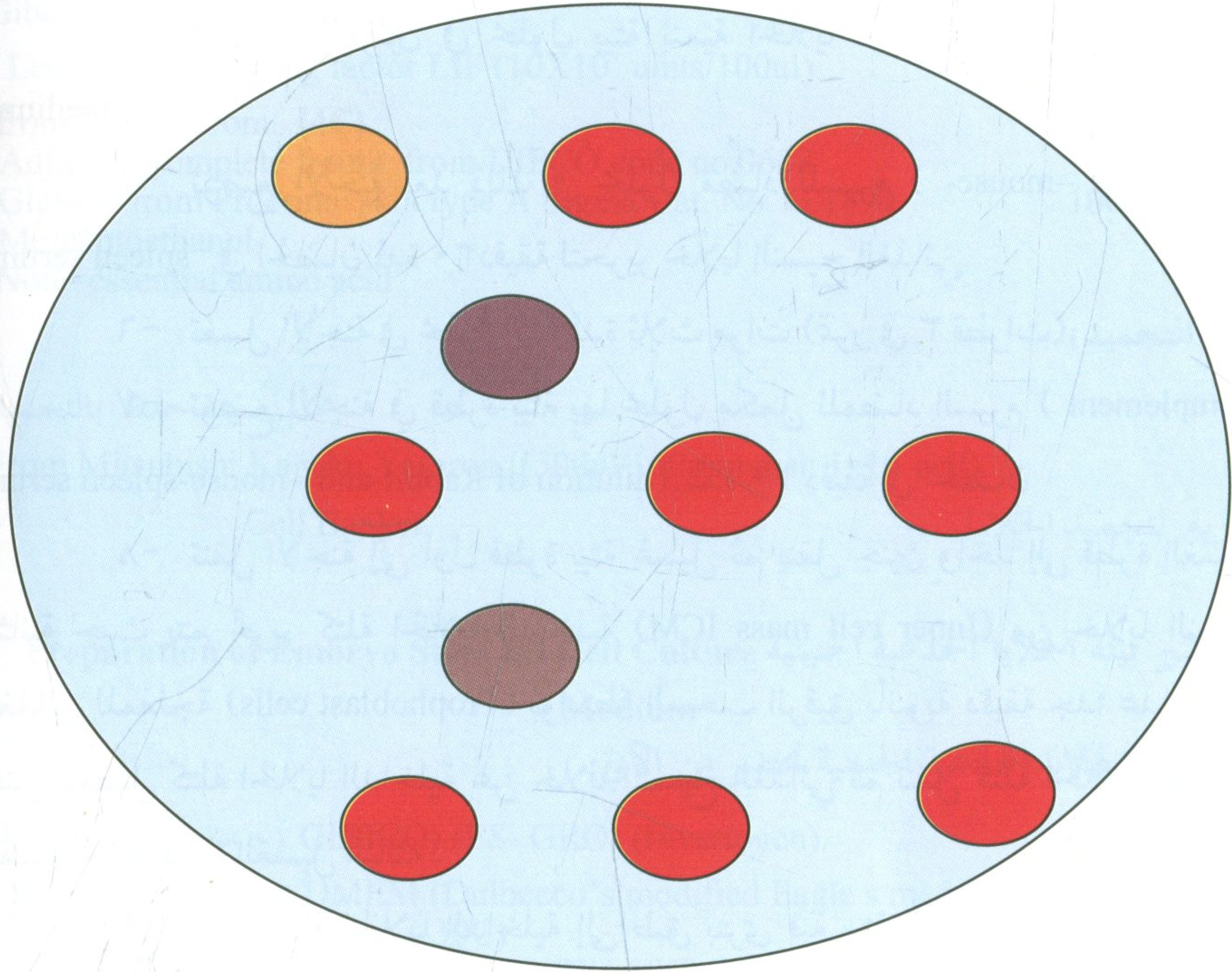
٨- تنقل الأجنة إلى أول قطرة بيئة غسيل ثم ينقل جنين واحد إلى قطرة الغسيل الثانية حيث يتم تحرير كتلة الخلايا الداخلية (Inner cell mass ICM) من خلايا النسيج الغذائي للمفلجة (Trophoblast cells) بواسطة السحب الرقيق بأنبوبة دقيقة جدا عدة مرات حتى تنفصل كتلة الخلايا الداخلية عن خلايا النسيج الغذائي ثم تنقل كتلة الخلايا الداخلية المفصولة إلى قطرة الغسيل الثالثة .

٩- تنقل كتلة الخلايا الداخلية إلى طبق بترى فيه بيئة تنمية خلايا جذعية بدون زيت البرافين للتخلص من بقايا الزيت ثم تستخدم ماصة دقيقة جديدة.

١٠- تنقل كتلة الخلايا الداخلية ICM) إلى طبق بتري فيه أربع حاويات يحتوى على خلايا مغذية (Feeder cells) ، (قد تم تجهيزه وتم تغيير البيئة فيه إلى بيئة تنمية الخلايا الجذعية غير مغطاة بزيت البرافين) (ES cell culture) بحيث توضع كل كتلة خلايا واحده في وسط الحاوية ثم تنمى لمدة ٣-٤ أيام في الحضان (الشكل رقم ١٩,٢).

١١- بعد ٣-٤ أيام يتم فحص الطبق ويؤخذ منتصف كتلة الخلايا الداخلية وتوزع لثلاث أجزاء في طبق بترى جديد فيه خلايا مغذية ، ويتم التخلص من الأطراف لكتلة الخلايا ؛ لأنها قد تكون جزءاً من خلايا نسيج غذائي بواسطة الشفط بأنبوبة شعرية جدا.

١٢- بعد ١-٢ يوم يتم أيضا تقطيع كتلة الخلايا الداخلية كل واحده ثلاث أجزاء بنفس الطبق وبذلك تكون الخلايا الجذعية الجنينية قد تكونت من كتلة الخلايا الداخلية ويتم تغيير البيئة فقط كل يوم أو يومين.

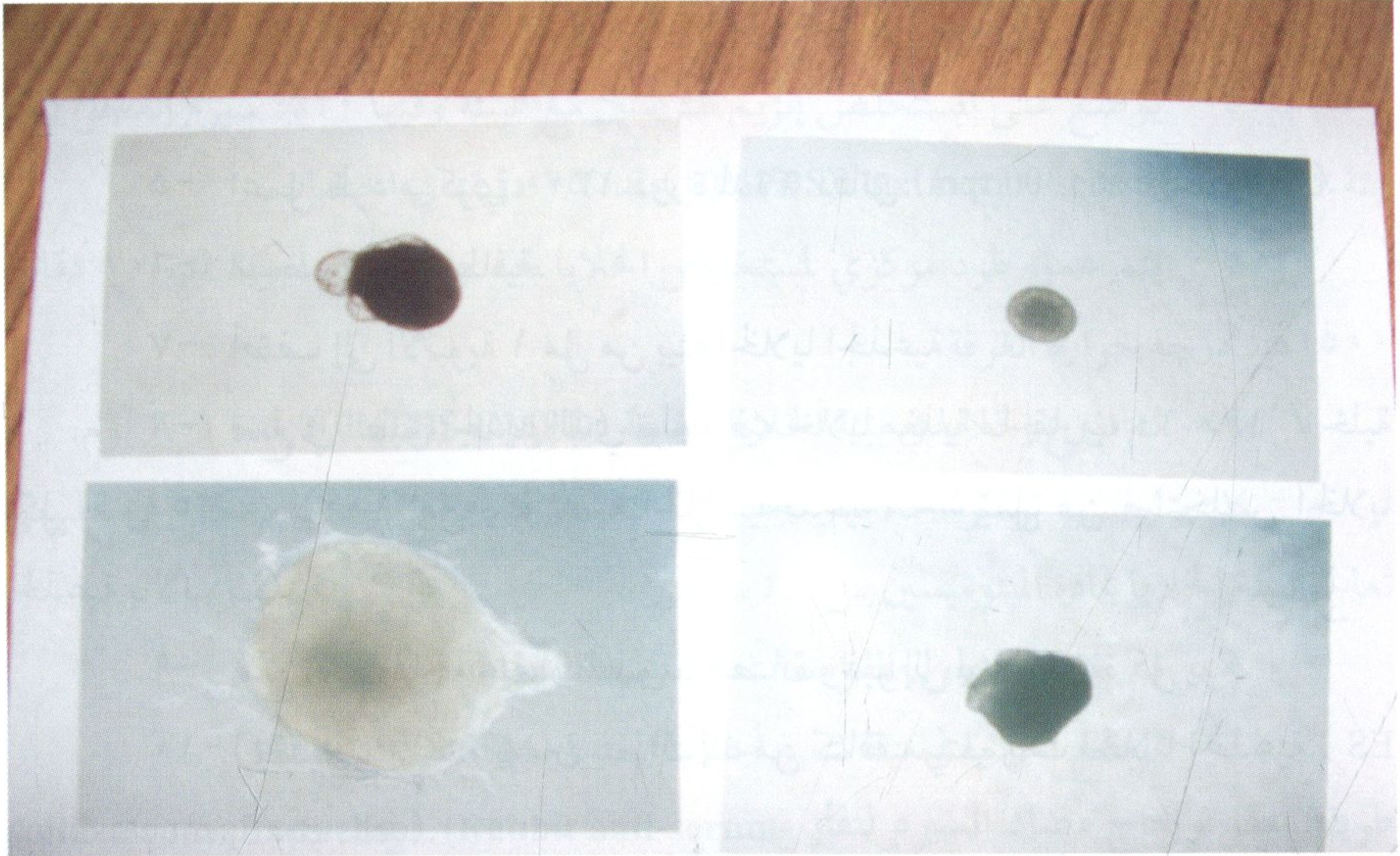


الشكل رقم (١٩,١). طبق بتري يحتوى على ١١ قطرة للتخلص من الغشاء الشفاف واستخلاص كتلة الخلايا الداخلية للمفلجة For immunosurgery of Blastocyst:

أول قطرة (القطرة الصفراء) تحتوى على إنزيم البرونيز (٠,٥٪ in PBS)

قطرة واحدة (بنفسجي فاتح) تحتوى على مضاد السيرم (Anti-serum 20 ul in 30ul ES cell culture medium) ٨ قطرات (حمراء) تحتوى على بيئة خلايا جذعية.

أ) كتلة الخلايا الداخلية محاطة بخلايا نسيج غذائي ب) مرحلة بداية تمدد الخلايا الجذعية الجنينية.



الخلايا الجذعية بعد يومين من الزراعة تكون الجسم الجنيني (Embryonic body).

الشكل رقم (١٩,٢). صور لمراحل تكون الخلايا الجذعية الجنينية.

تمرير الخلايا الجذعية للفأر Passage of mouse ES cells

ثم تتم عملية تمرير الخلايا الجذعية من طبق لآخر كل ٢-٣ أيام حسب الخطوات التالية :

• بعد تنمية الخلايا الجذعية في الطبق لمدة ٣-٤ أيام لابد من تغيير الطبق والبيئة التي تنمى بها الخلايا الجذعية (لأن الخلايا المغذية والبيئة تكون استهلكت) حسب الخطوات التالية :

١- يتم سحب البيئة من الطبق الذي فيه الخلايا الجذعية بالشفط في كابينة التعقيم.

٢- يضاف إنزيم التربسين (٠,٢٥ ٪)معه محلول المنظم (EDTA 0.04%) مخلوط مع محلول الفسيولوجي المتعادل (PBS) إلى طبق تنمية الخلايا الجذعية.

٣- ضع الطبق بالحضان لمدة ٣ دقائق. ثم ضع محتويات الطبق في أنبوبة.

٤- اغسل بإضافة ٢ مل من بيئة فيها سيرم العجل للأنبوبة (١٠٪) +DMEM Fetal bovine serum (10%FBS)٥٠٠ ميكرو مل محلول السيرم، ١٠٠٠ ميكرو مل بيئة (٢:١).

٥- اعمل طرد مركزي ١٣٠٠ دورة لمدة ٥ دقائق (Centrifuge at 1300 rpm).

٦- اسحب البيئة الطافية.

٧- أضف إلى الأنبوبة ١ مل من بيئة الخلايا الجذعية .

٨- ضع في الطبق الجديد الذي توجد فيه خلايا مغذية ما يقارب ١٠ ×١٠^٦/ خلية لكل طبق ٣٥مم (٣٠٠٠مل بيئة تنمية الخلايا الجذعية، ٢٥٠مل من مستخلص الخلايا الجذعية بالأنبوب) .

٩- ضع الخلايا الجذعية أو الطبق بالحضان وغير إلى بيئة جديدة كل يوم.

١٠- بعد التنمية لمدة يومين يتم التأكد من كثافة مستعمرات الخلايا الجذعية (ES cells confluent condition).

إنتاج وتكوين الجسم الجنيني Embryonic body cells

إذا تركت الخلايا الجذعية لمدة أكثر من ٤ إلى ٧ أيام في الطبق فإنها تبدأ تكوّن جسم جنيني ثم في اليوم الثامن تتمايز وتكون خلايا جسم جنيني (Embrynic body cells) يشبه البالون (الشكل رقم ١٩،٢).

١- لهضم الخلايا توضع على الخلايا في الطبق محلول إنزيم التربسين (٠،٢٥ ٪) في محلول إيدتا في محلول فسيولوجي (25% Trypsin in 0.04 EDTA in PBS.) لمدة ٣ د في الحضان.

٢- تسحب الخلايا ثم تغسل الخلايا بواسطة محلول البيئة (DMEM) في أنبوبة .

٣- توضع الأنبوبة في الطرد المركزي لمدة ٥ دقائق ١٥٠٠ دورة /د (1500 rpm).

٤- توضع في البيئة لمدة يوم واحد فقط ثم تغير إلى بيئة (DMEM)تغير البيئة كل ٣ أيام.

طريقة إنتاج وتكوين الخلايا الجنينية المغذية للفأر (Mouse Feeder Cells MEF)

١- يتم تشريح أنثى حامل واستخلاص أجنة عمرها ١٣،٥ من الأم الحامل.

٢- يتم التخلص من جميع الأطراف والرأس للجنين ويستخدم جذع الجنين فقط.

٣- يوضع جذع الجنين في طبق ويتم تنسيرة وتقطيعه إلى قطع صغيرة لتكوين مستخلص.

٤- يوضع على المستخلص إنزيم التربسين مع البيئة وفيها ١٠% سيرم العجل في بيئة (10%FBS)Fetal bovine serum+ DMEM) لمدة ١٥ دقيقة في الحضان.

٥- يتم عمل طرد مركزي لمستخلص الخلايا بعد وضعها في أنبوبة لمدة ١٠ دقائق ١٥٠٠د.د درجة حرارة الغرفة.

٦- ثم ازرع الخلايا في بيئة الخلايا المغذية (10%FBS-DMED) لمدة ٢-٣ يوم.

٧- احسب تركيز الخلايا في البيئة إذا كان هناك تجمع للخلايا بشكل غير طبيعي تعالج البيئة الخلايا بمادة الميتوميسين س لمدة ساعتين.

٨- ثم تغسل بمحلول الفوسفات المتعادل الفسيولوجي (PBS) .

٩- توضع الخلايا في بيئة تنمية الخلايا المغذية (10%FBS-DMEM).

طريقة عمل وإنتاج مضاد السيرم للفأر Anti -serum production (Rabbit anti-serum-anti –mouse –spleen serum)

١- يتم تجهيز مستخلص من خلايا طحال الفأر بسحق و طحن خلايا طحال للفأر بمحلول الفوسفات الفسيولوجي (PBS).

٢- يؤخذ عدد الخلايا من مستخلص طحال الفأر تقريبا ١ × ١٠^٨/ مل ويخلط مع سائل ١ : ١(Adjuvent complete freunt from DIFCO code no.0638)

حقن المخلوط عبر الوريد الأذن الطرفي للأرنب لمدة ثلاث مرات كل أسبوعين مرة.

٤- بعد أسبوع من الحقنة الثالثة يمكن استخلاص الدم من الأرنب (حقنه بالقلب) واستخلاص السيرم من الدم والذي يحتوى على مضاد لخلايا النسيج الغذائي لمفلجة أو جنين الفأر).

يمكن أن تستخدم الأرنب مرتين أو ثلاث كل فترة حسب الحالة للأرنب.

أما بالنسبة لإنتاج المتمم (Complement) فيمكن أن يستخدم السيرم للأرنب غير المعالج ١ : ٤(١سيرم أرنب: ٤ بيئة تنمية خلايا جذعية).

طريقة حفظ وتجميد الخلايا الجذعية أوالخلايا المغذية (-٨٠ °م):

- يتم تحرير الخلايا الجذعية بواسطة إنزيم التربسين (٠,٢٥٪) لمدة ٣ د.
- توضع المحتويات في أنبوبة و يتم عمل طرد مركزي ١٢٠٠ د/ لمدة ٥ د.
- يتم التخلص من سائل البيئة.
- يتم إضافة سائل الحفظ ٠,٥٠ ميل لكل ١٠٠ مم طبق بتري (Cell Banker from (Mitsubishi Kagaku Yatoron 500ul/100mm dish 1x10^7cell).
- يقسم المحلول وبه الخلايا على أنابيب تجميد صغيره ٥٠٠مل كل واحده.
- توضع الأنابيب في حاوية التبريد (Biocell Deep freezing Vessels 80-)
- ضع الحاوية في ثلاجة التجميد العميق (-٨٠°م) سوف تنزل الخلايا ١ د°م/ ساعة.
- بعد يوم يمكن أن تستخرج الأنابيب وتوضع في صندوق الحفظ في التجميد العميق.

ولاستخدام الخلايا يمكن أن توضع أنبوبة الخلايا المجمدة في حاوية التجميد مرة أخرى ثم توضع في درجة حرارة الغرفة أو توضع في ماء جارى حتى يذوب الثلج.

- يعمل طرد مركزي للمحلول ويتم التخلص من السائل.
- ثم تغسل بمحلول تنمية الخلايا الجذعية ثلاث مرات للتخلص من محلول حفظ الخلايا.
- ثم تنمى الخلايا في طبق بتري.

طريقة تحضير الطبقة الليفية لأطباق بتري لتنمية الخلايا المغذية عليها:

- يوزن ٠,١ ٪ جرام من بودرة الجيلاتين ويذوب في محلول فسيولوجي (PBS).
- يفرغ محتويات محلول الجيلاتين في أطباق بتري المراد تنمية الخلايا فيها بما يغطى القاع.
- وتترك الأطباق مغطاة بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة تقريبا.
- يتم سحب السائل الزائد وتترك حتى تجف الأطباق وهي مغطاة.
- عدها توضع الأطباق في درجة حرارة ٤ مْ لحين استخدامها.

طريقة استخلاص الخلايا التناسلية الأولية من الجنين

يمكن أن تستخلص الخلايا التناسلية الأولية من جنين عمره ٨,٥ يوم وتكون في النهاية الطرفية لجذع الجنين حيث يتم أخذ الجزء الطرفي لمنطقة نهاية جذع الجنين ويتم تنسيرها

ثم معالجتها بإنزيم التربسين لمدة ٣-٥ د في الحضان ثم توضع محتويات الطبق في أنبوبة للطرد المركزي ثم يغسل الراسب بمحلول البيئة ثم توضع الخلايا في طبق لتنميتها كخلايا جذعية تناسلية أو جرثومية .

تقرير العملي التاسع عشر:
تكوين الخلايا الجذعية وزراعتها في الفأر

اسم الطالب : .... رقم الطالب : ....

١ - كم عدد الأجنة المتحصل عليها من الإناث؟

....

٢- كيف تم التخلص من الغشاء الشفاف الذي يحيط بالأجنة؟

....

....

٣- كم كتلة خلايا (Inner cell mass ICM) التي تم استخلاصها من الأجنة؟

....

٤- عدد المراحل التي تمت لتحضير الخلايا الجذعية الجنينية ومتطلباتها:

أ) مرحلة ....

ب) مرحلة ....

ج) مرحلة ....

د) مرحلة ....

٥- ما الخطوات الواجب اتباعها لتجنب تلوث زراعة الخلايا الجذعية؟

....

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي العشرون

الحقن المجهري للجينات في بويضات الفأر
Gene Injection in Mice Ova [٢٨]

الهدف

يهدف هذا الدرس العملي إلى إعطاء الخلفية العلمية والتقنية والتدرب على الهندسة الحيوية وتقنيات التكاثر وإنتاج أجنة معدلة وراثيا. ومع هذا الدرس العملي سوف يكتسب الطلاب الخبرة في طريقة حقن الجينات في اللاقحة باستخدام جهاز الحقن المجهري Micromanpulatore.

تكمن أهمية هذا الدرس العملي في التدخل في تقنية إنتاج الحيوانات المعدلة وراثيا في استقصاء الجينات وأدائها ومن ثم استخدامها في المعالجات لبعض الأمراض الوراثية للإنسان وفي إنتاج بعض العقاقير والتحسين الوراثي في الإنتاج الحيواني والنباتي. ثم إمكانية تسويق الحيوانات المعدلة وراثيا للأبحاث العلمية.

المواد والأجهزة المستخدمة

بيئات لتنمية البويضات والأجنة وزيت معدني (KSOM; M2with HEPS ; M16 media (Mineral oil,from Sigma com. هرمونات لتنشيط المناسل لإناث الفئران (Follicle stimulating hormone FSH, or Pregnant mare serum gonadotropine PMSG, and (Lutenizing hormone LH or Human chorionic gonadotropin hCG from Sigma com.)

إبر الحقن المجهري والإمساك بالبويضة إما جاهزة الصنع (Micropipitty injection).

---

(٢٨) Heiser (2004) /Alhimaidi (2005).

• أو تصنع بالمعمل بواسطة أجهزة تصنيع الإبر الدقيقة، جهاز سحب الإبر Micropipitty Puller وجهاز ثنى الإبر (Microfuorge) وجهاز برد الإبر (Micropipitty grinder).

• مجهر تشريحي ومجهر الحقن المجهري (Micromanpulator) .

خطوات التجربة

يشتمل العملي على:

أولاً: عمل إبر الحقن المجهري Micropipitty preparation

• يمكن الحصول على أنابيب الحقن الدقيقة (Micro injection pipitty) جاهزة الصنع كما يمكن عمل الأنابيب الدقيقة والخاصة بالحقن المجهري بواسطة أجهزة عمل الأنابيب الدقيقة جهاز السحب والبرد الدقيقة (Micropipitty Puller and Grinder).

• حيث تثبت الأنبوبة الزجاجية الدقيقة على جهاز السحب Micropipitty Puller بحيث تمرر عبر منتصف فتيلة الجهاز إلى منتصفها (الشكل رقم ٢٠,١).

• يشغل الجهاز بتسخين الفتيلة (52°C) حتى تنقطع الأنبوبة الزجاجية الدقيقة.

• يؤخذ الجزء العلوي للأنبوبة الزجاجية ثم تثبت على جهاز ثني الأنابيب الدقيقة (Microfuorge) بحيث يكون طرفها مقابل فتيلة الجهاز وذلك بالنظر عبر العدسة العينية للجهاز.

• ثم تسخن الفتيلة ويوضع طرف الأنبوبة الزجاجية على طرف الفتيلة بشكل عمودي ثم يسحب بسرعة إلى الأعلى لكي يتكون طرف مدبب للأنبوبة الزجاجية الحاقنة (الشكل رقم ٢٠,١).

• لكي يسهل استخدام الأنبوبة تحت المجهر لابد من ثنى طرف الأنبوبة الدقيق بزاوية ٣٠ درجة تقريبا، وذلك بوضع الفتيلة بالقرب من أحد جانبي الأنبوبة على بعد ٥ مم من طرفها المدبب تقريبا ثم تقرب وتبعد الأنبوبة الزجاجية من الفتيلة لحين الحصول على زاوية الانحناء المطلوبة والمبينة على العدسة العينية للجهاز.

• بعد ذلك تنقل الإبرة الحاقنة إلى جهاز البرد الدقيق ويثبت طرفاها على رحاة الجهاز بشكل مائل ثم يشغل الجهاز لتدور الرحاة إلى أن يتم ملاحظة عملية البرد بواسطة العدسة العينية للجهاز.

• لتنظيف الأنبوبة الحاقنة الدقيقة توصل بطرف أنبوبة بلاستيكية متصلة مع حقنة ٥ مل ثم يشفط بواسطتها محلول مخفف من حمض الكبريتيد (١,٠٪) ثم يدفع في طبق بتري ثم تغسل مرة أخري بالماء المقطر بنفس الطريقة.

• أما أنابيب المسك الدقيقة (Holding pipettes) والتي تستخدم لمسك البويضات تحت المجهر الدقيق فإنها تعمل بواسطة سحب الأنبوبة الزجاجية الدقيقة عن طريق جهاز سحب الأنابيب بحيث تقطع الأنبوبة الزجاجية من المنتصف.

• ثم تنقل الأنبوبة إلى جهاز ثنى الأنابيب الدقيقة (Microforage) لكي يتم صنع أنبوبة المسك الدقيقة فإن طرف الأنبوبة يوضع في مواجهة الفتيلة للجهاز وذلك بالنظر عبر عدسة الجهاز ثم تسخن الفتيلة وتقرب الأنبوبة للفتيلة حتى يتم تضييق طرف تجويف الأنبوبة (الشكل رقم ٢٠,١).

ثانياً: جمع البويضات المخصبة حديثا من قناة البيض للفأر

لجمع بويضات مخصبة حديثا وبكميات كبيرة من إناث الفئران.

١- لابد من حقن الإناث قبل يومين من التجربة بكمية ١٠ وحدة دولية من الهرمون المحفز لنمو الحويصلات في المبيض (Follicle stimulating hormone FHS or PMSG).

٢- ثم بعد ٤٨ ساعة تحقن بهرمون التبويض (Lueinizing hormone LH) وبكمية ١٠ وحدة دولية.

٣- ثم يوضع ذكر مع كل أنثى حتى يتم التزاوج في المساء.

٤- تفحص الأناث في الصباح الباكر لليوم التالي، لرؤية السدادة المهبلية في الإناث التي لقحت.

٥- تُشَرَّح الإناث التي حصل لهـا تلقيح ثم تستخرج قنـاة البيض وَتُنَسَّر تحت المجهر التشريحي لاستخـراج البويضـات في بيئة تحتوي علـى منظـم للأس الهيروجيني (M2 with HEPES, from sigma com.).

٦- ثم تنقل البويضات إلى قطرات من البيئة (٥٠ ميكروليتر 50ul) ثم تغطى القطرة بالزيت المعدني الخفيف (Light mineral oil) ثم توضع في الحضان لحين استخدامها للحقن.

ثالثاً: الحقن المجهري للجينات في اللاقحة بعد عملية الإخصاب

- لابد من إجراء الحقن المجهري بعد ٦-٨ ساعات من الإخصاب وقبل اندماج النوية الذكرية بالنوية الأنثوية للبويضة.
- تجهز كمية من الجين المراد حقنها في البويضات في طبق بتري وتوضع في قطرة من البيئة في طبق ثم توضع قطرة أخرى من البيئة تنقل إليها البويضات المراد حقنها وتغطى بالزيت بعد نقل البويضات إليها.
- ثم تحت مجهر المعالجات الدقيقة أو مجهر الحقن المجهري (Micromanpulator) يتم سحب كمية قليلة جدا من القطرة التي فيها الجين المراد حقنه (1-2 ul) بواسطة إبرة الحقن المجهري (Microinjection needle).
- ثم يتم الانتقال إلى قطرة البويضات ويتم الإمساك بإحدى البويضات والتي تحتوي على نويتين فقط (ذكرية وأنثوية) وذلك بواسطة أنبوبة المسك الدقيقة (Holding pipette) تحت المجهر الدقيق (الشكل رقم ١،٢٠).
- ثم يتم إدخال الحاقنة الدقيقة ذات الطرف المدبب إلى داخل البويضة ثم يتم اختراق الغشاء النووي للنوية الكبيرة (الأنثوية) بشكل خفيف ورقيق حتى تصل بطرف الإبرة إلى طرف الغشاء النووي الآخر، وعندها تلاحظ النوية كأنها انتفخت فهذا يدل على أن القطرة التي في الإبرة قد خرجت من الأنبوبة الحاقنة، وبذلك فقد تم حقن الجين إلى داخل النوية الأنثوية، ثم تسحب الإبرة الحاقنة برفق إلى الخلف. تكرر الخطوات السابقة مع بقية البويضات المراد حقنها.

رابعاً: تنمية الأجنة

- بعد حقن البويضات بالجين تنقل البويضات إلى قطرة من بيئة تنمية الأجنة (KSOM or M16) ثم تغطى بالزيت المعدني وتوضع في حضان درجة حرارتة ٣٧°م مزود بالهواء وثاني أكسيد الكربون ٥٪ لتنميتها.

• ثم في اليوم الثاني يتم فحص الأجنة تحت مجهر مقلوب العدسة وتسجيل الملاحظات عن الأجنة.

خامساً: نقل الأجنة المعدلة وراثيا جراحيا لإناث ذات حمل كاذب

• بعد عملية الحقن للجينات يتم نقل الأجنة الناميه إلى طور ٢-٤-٨-١٦ خلية ويفضل نقل الأجنة التي في طور التوتية أو المفلجة (البلاستولة) إلى أم مستقبلة مهيأة فسيولوجيا.

• حيث يتم تجهيز أنثى كما سبق شرحة في الدرس العملي السابق لنقل الأجنة بحيث تستخدم إناث ذات حمل كاذب أي لقحت بذكر مخصي قبل يوم أو يومين من عملية نقل الأجنة لها.

• يتم نقل الأجنة بواسطة العملية الجراحية عن طريق تخدير إحدى الإناث بحقنها بمادة مخدرة (Ketamdor10% ; 0.05 ml).

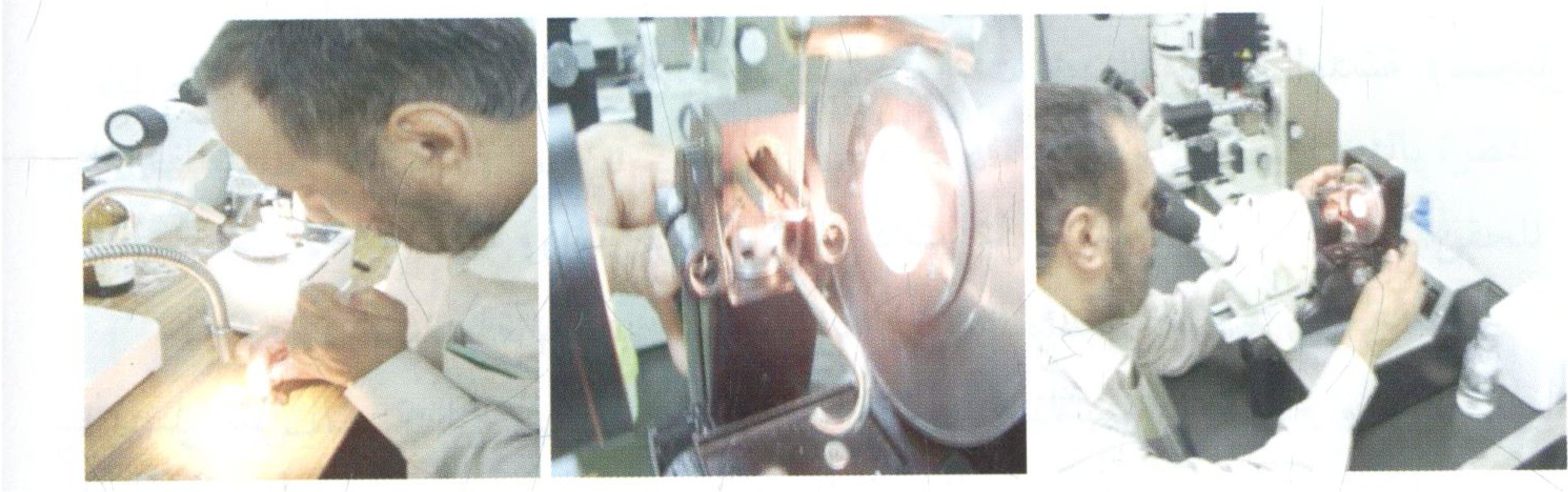
• ثم يتم حلق الشعر من جهة أحد جانبي الظهر حول منطقة قناة البيض ثم يتم عمل قطع في الجلد والتجويف البطني وتستخرج قناة البيض وتثبت على ورقة ترشيح صغيرة معقمة، ثم توضع الأنثى المستقبلة تحت المجهر التشريحي.

• تسحب الأجنة المراد حقنها مع كمية قليلة من البيئة ١٠ ميكرون (10 ul) بواسطة إبرة زجاجية دقيقة متصلة بأنبوبة بلاستيكة أو حقنة امل تحت المجهر التشريحي.

• ثم تحقن البويضات داخل تجويف قناة البويضة برفق إما عن طريق فوهة قناة البيض أو بواسطة اختراق جدار قناة البيض بواسطة طرف الإبرة الزجاجية.(الشكل رقم ٢٠,٢).

• يتم خياطة الجرح بواسطة خيوط الجراحة الداخلية والخارجية، ثم يتم متابعة الإناث لحين الولادة بعد ١٩ -٢٠ يوما تقريبا.

• يتم تسجيل الملاحظات على المواليد ومواصفاتها حسب الجين المحقون.

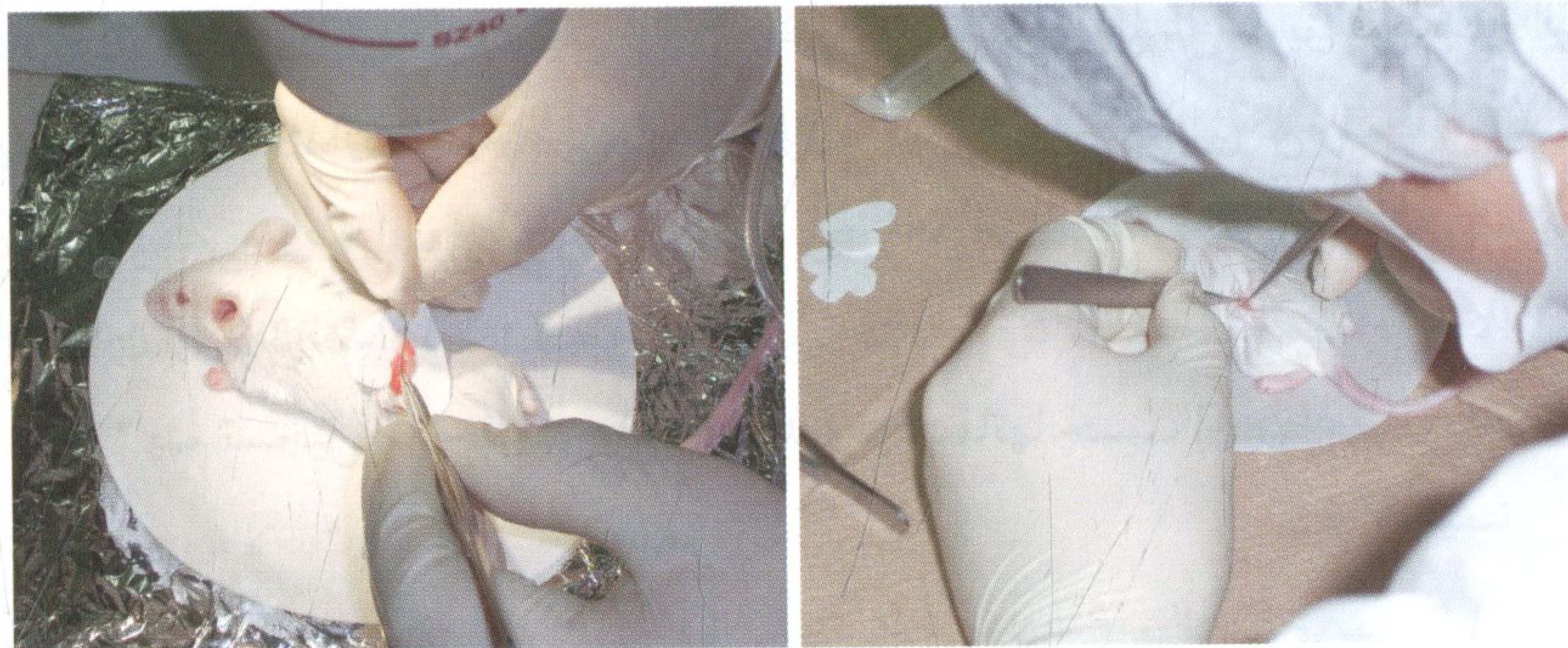


الشكل رقم (١,٢٠). يوضح خطوات عملية تجهيز وحقن الجين أو الحيوان المنوي في البويضات.

أولاً: عمل الأبر الدقيقة للحقن المجهري:

طريقة عمل أبر الحقن المجهري بإستخدام جهاز سحب الأنابيب الدقيقة ثم بردها بواسطة جهاز البرد الدقيق وتنظيفها.





الشكل رقم (٢,٢٠). يوضح الشكل عملية نقل الأجنة المعدلة وراثيا جراحيا إلى الأنثى المستقبلة.

ثانياً: الحقن المجهري للجينات داخل نويات اللاقحة باستخدام الحقن المجهري وإنتاج أجنة معدلة وراثيا.

الحقن باستخدام جهاز الحقن المجهري حقن الجين في البويضة تحت المجهر نمو البويضات المحقونة.

تقرير العملي العشرون :
الحقن المجهري للجينات في بويضات الفأر

اسم الطالب : .... رقم الطالب : ....

١- كم أنثى تم استخراج البويضات منها؟

....

٢- كم عدد البويضات التي جمعت من الإناث؟

....

٣- كم بويضه كانت تحتوي على نويتين (ذكرية وأنثوية)؟

....

٤- كم بويضة كان فيها أكثر من نويتين؟ وما هو تعليلك لها؟

....

٥- ما الجينات أو المادة التي حقنت في البويضات؟

....

٦- كم عدد البويضات التي حقنت؟

....

٧- كم عدد الأجنة التي نمت إلى طور الخليتين فأكثر؟

....

٨- كم عدد الإناث التي تم نقل الأجنة النامية إليها؟

....

٩- كم عدد الأجنة التي تم نقلها للإناث؟

....

١٠- كم عدد الإناث التي أكملت الحمل وأعطت مواليد؟

....

١١- كم عدد الأجنة التي تم إنتاجها وفيها الجينات المعدلة وراثيا؟

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

العملي الحادي والعشرون

دمج الأجنة في الفأر

Chimera Formation in Mice (٢٩)

الهدف

يهدف هذا الجزء العملي إلى تعلم طرق لدمج الأجنة في مرحلة التلفج، ثم إنتاج أجنة مدمجة، حيث يمكن دمج جنينين أو أكثر لإنتاج جنين واحد له أكثر من أبوين (Tetra paternal or Hexa paternal) وهو مناسب للدراسات الوراثية والفسيولوجية.

المواد والأدوات المستخدمة في التجربة

- إبر معدنية لعمل حفر في أطباق بتري لدمج الأجنة، مع أطباق بتري صغيرة.
- إناث فئران حوامل في مرحلة مبكرة (مرحلة التفلج).
- إنزيم البرونيز في محلول الفوسفات الفسيولوجي (5% Pronase in PBS).
- بيئات لتنمية الأجنة وزيت معدني لتغطية البيئات في الطبق (Mineral oil; M16; KSOM).
- مجهر تشريحي ومجهر مقلوب العدسة (Inverted microscopy).
- جهاز الدقاق أو جهاز عمل الثقب المجهري الدقيق في الغشاء الشفاف للبويضة (Peizo injection). أو بواسطة أشعة الليز.

---

(٢٩) Austin and Short (1982).

طريقة دمج الأجنة: Chimeric embryo production, two embryos together or with embryonic stem cells (ES) injection in blastula.

يمكن دمج الأجنة بطريقتين:

١- بدمج أجنة بنفس العمر (طور الخليتين مع بعض أو طور ٤ أو ٨ خلايا أو طور التوتية.

٢- أو بحقن المفلجة: وذلك بطريقتين:

أ) بحقن البلاستولة بكتلة الخلايا الداخلية لبلاستولة جنين آخر.

ب) بحقن أو دمج خلايا جسدية أو خلايا جذعية وحقنها داخل المفلجة أو البلاستولة.

أولاً: دمج الأجنة بنفس العمر

- يتم استخراج الأجنة من الإناث مختلفة السلالة بيضاء وسوداء (Balb/c 'C57/6J' DBA) في طور٢-٤- ٨- أو التوتية (بعد١ - ٢,٥ يوم من التلقيح).
- يتم وضع الأجنة في قطرة بيئة الأجنة (M16 or KSOM) بطبق بتري بها إنزيم (٠,٥٪) (0.5 % pronase in PBS) وتوضع في الحضان لمدة 3-5 دقيقة تقريبا للتخلص من الغشاء الشفاف.
- تغسل الأجنة بتمريرها في ثلاث قطرات بيئة للتخلص من أثر الإنزيم.
- تُعمل حفر صغيرة في قاع طبق بتري صغير بواسطة رأس الإبرة المعدنية في كل قطرة بيئة تنمية.
- تنقل الأجنة بحيث يوضع كل جنينين مختلفين بالسلالة ولكن بنفس العمر أو مرحلة النمو في الحفرة الصغيرة (الشكل رقم ٢١,١).

ثم يوضع على كل جنين مجموعة من الخلايا الجذعية في بيئة تنمية الأجنة(KSOM)

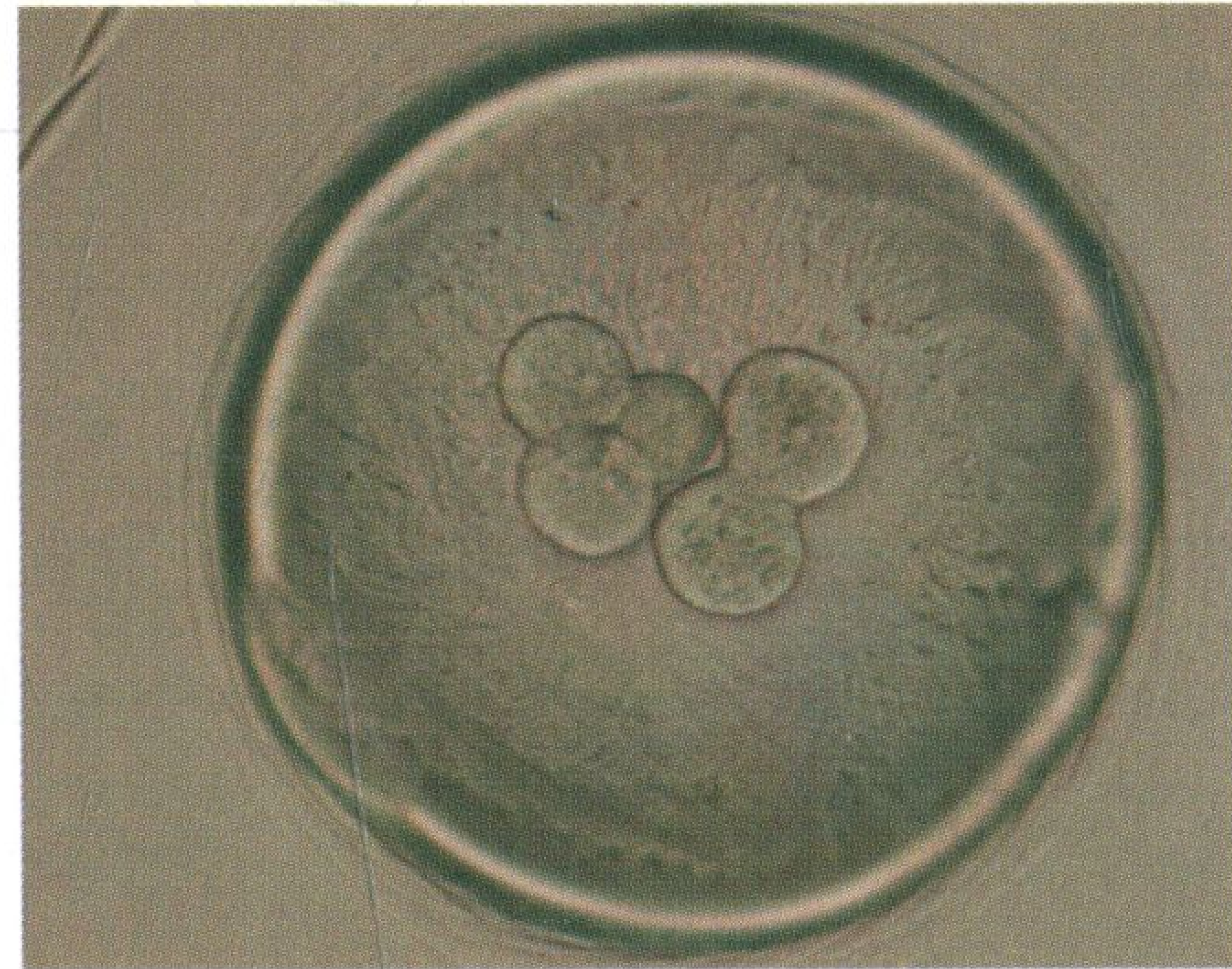
- تترك الأجنة لمدة يوم أو إلى طور المفلجة في الحضان.
- تنقل الأجنة إلى أم مستقبلة (ذات حمل كاذب بنفس العمر للأجنة) بالعملية الجراحية.

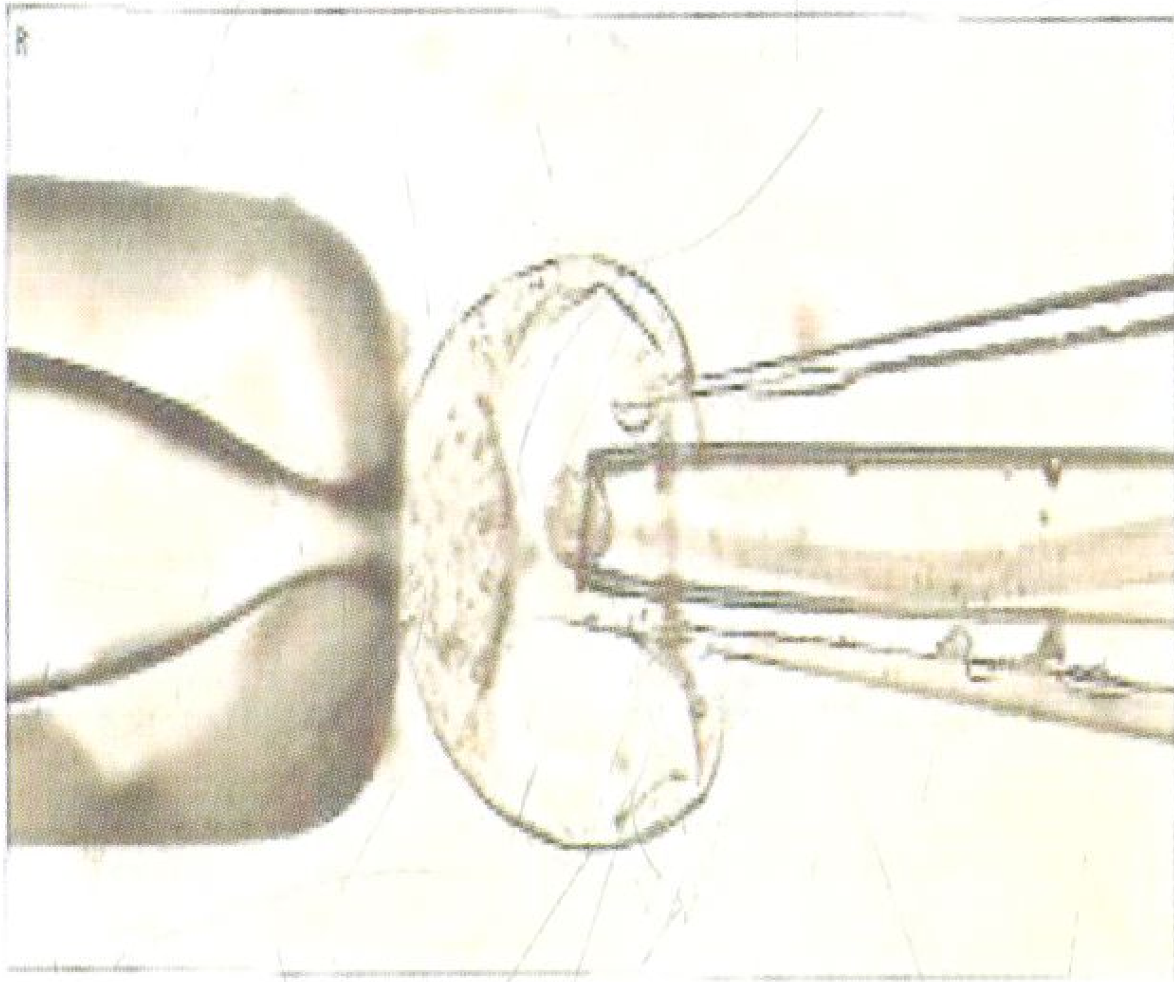
ثانياً: دمج الأجنة بحقن المفلجة بالخلايا الجذعية أو بكتلة الخلايا الداخلية

Blastula ES injection or Inner cell mass injection (ICMI)

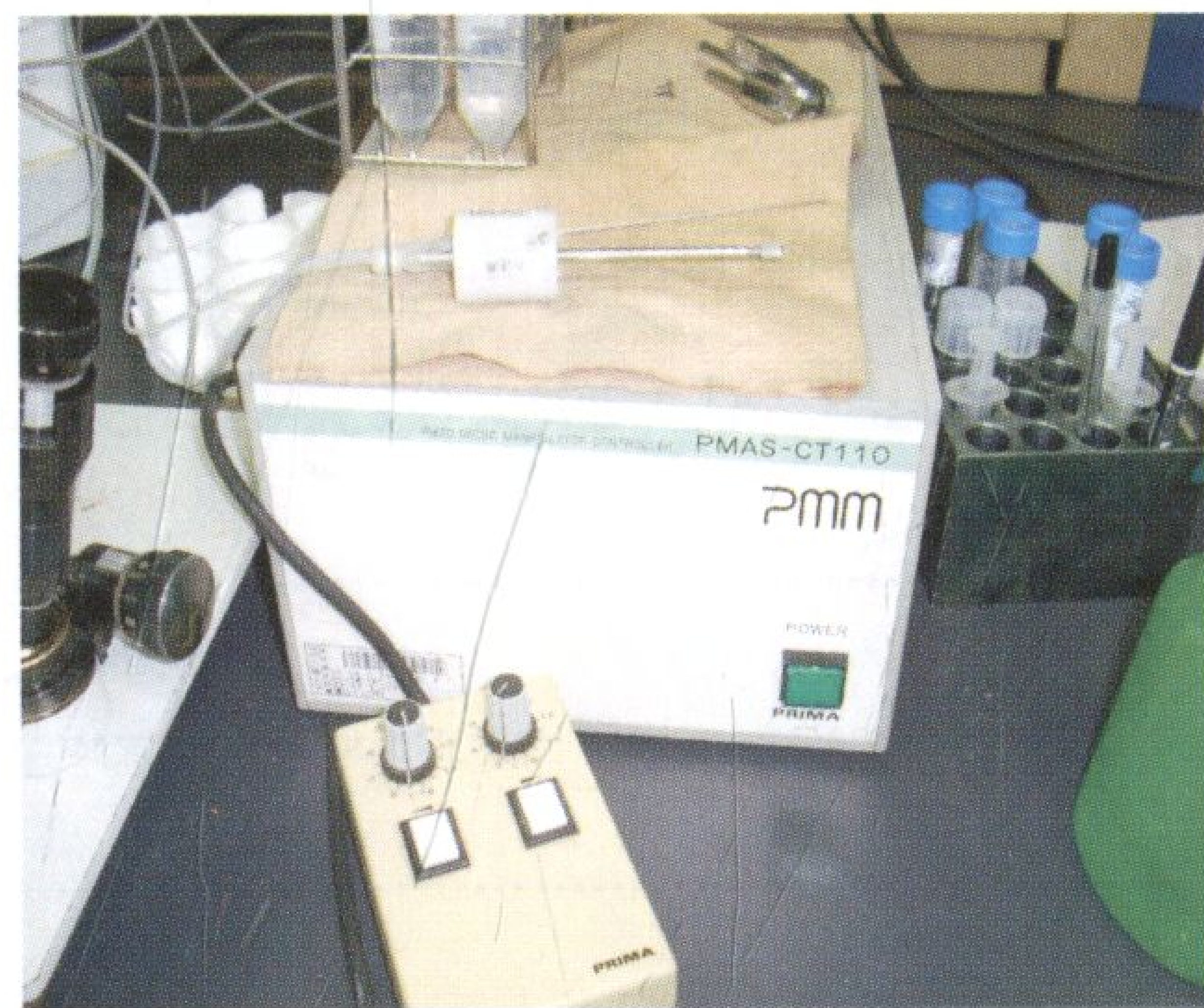
- يمكن جمع الأجنة من الأنثى الحامل في اليوم الثالث أو الرابع من التلقيح أو رؤية السدادة المهبلية (٢,٥- ٣,٥) Day.

- يتم تجهيز جهاز الحقن المجهري للحقن بواسطة الثاقب الدقيق (Peizo injection) (الشكل رقم ٢١,٢).
- كما يتم تجهيز طبق فيه عدد من قطرات البيئة للأجنة وللخلايا الجذعية وقطرات للحقن والغسيل مغطاة بزيت البرافين.
- ثم تحت المجهر لجهاز الحقن المجهري يتم حقن مجموعة من الخلايا الجذعية داخل كل مفلجة.
- تترك الأجنة في قطرة البيئة في الحضان لحين نقلها لأم مستقبلة بنفس اليوم.





الشكل رقم (٢١,١). يوضح طرق دمج الأجنة بوضع الأجنة في حفرة في قاع طبق بتري، أو بحقن المفلجة.





الشكل رقم (٢١,٢). يوضح جهاز الدقاق أو الثقب المجهري الدقيق في الغشاء الشفاف للبويضة (Peizo injection) ثم صورة لجنين مدمج أبيض عن طريق حقن البلاستولة بكتلة الخلايا (أسود).

تقرير العملي الحادي والعشرون:
دمج الأجنة في الفأر

اسم الطالب : .... رقم الطالب : ....

١ - ما سلالات الفئران المستخدمة لدمج أجنتها مع بعض؟

....

٢- كم عدد الأجنة التي تم جمعها من كل سلالة؟

السلالة ١ - .... السلالة ٢- ....

٣- ما أعمار الأجنة أو في أي طور؟

....

٤- كم من الأجنة اندمجت في الطبق؟

....

٥- هل نمت أجنة مدمجة؟.......................... إلى أي طور وصلت؟........................

٦- هل تم حقن أجنة في مرحلة المفلجة : نعم؟...................... لا.............................

٧- إذا كانت الإجابة نعم ما نوع الخلايا المحقونة داخل المفلجة؟

خلايا جذعية................................ أو كتلة الخلايا الداخلية : ....

٨- هل تم نقل الأجنة المدمجة إلى أم مستقبلة؟...

٩- كم جنين نقل لكل أنثى؟..

١٠- هل ولدت أجنة مدمجة؟.................. وكم عددها أو نسبتها؟.........................

١١- إذا لم تتحصل على نتائج لدمج الأجنة ، علل عدم الحصول على نتائج؟

....

....

....

تقطع ورقة التقرير وتسلم للمعيد في نهاية وقت العملي.

المراجع
References

أولاً: المراجع باللغة العربية

الحميدي، أحمد عثمان الدوخي؛ محمد الغندور (١٤١٨هـ). *الأساسيات في عملي أجنة الفقاريات الوصفي والتجريبي*. مطابع جامعة الملك سعود. الرياض.

الحميدي، أحمد راشد؛ صالح عبدالعزيز الكريم (١٤٢٩هـ). *الأجنة التجريبي*. مطابع جامعة الملك سعود. الرياض.

الحميدي، أحمد راشد؛ عثمان عبدالله الدوخي؛ ياسر رجب الشوا (١٤٣٢هـ). *دليل الدروس العملية لأجنة الفقاريات الوصفي*. مطابع جامعة الملك سعود.الرياض .

العيسى، محمد ، أحمد الحميدي، صالح قنديل (٢٠٠٧). *تجميد السائل المنوي لذكور غزال الرمال العربي بإستخدام بيئة التريليديل وتريس. مجلة الخليج العربي للعلوم:* العدد ٢٥ (٤): ص (١٩٩-٢٠٦). Arab Gulf. J. Scient Res.25(4)199-206)

الكريم، صالح عبدالعزيز (١٤١١هـ). *المدخل إلى علم الأجنة الوصفي والتجريبي*. دار المجتمع. جدة.

ثانياً: المراجع باللغة الأجنبية

Abou-Tarboush, F.M., Al-Himaidi A.R., and El-Banna, A.A. (1994): Long term teratogenic effects of Mitomucin-C on the second gestation in mice. J. King Saud Univ. Vol 6 Science (1). 33-40.

Alhimaidi Ahmed R. (1999): Comparison of the in vitro fertilization of ova obtained from two mouse strains (Blab/c and C57) by three different methods and cultured in four different culture media. Arab Gulf. J. Scient. Res. Arab Gulf . 17 (1), 181-198.

Alhimaidi Ahmed R.(2005): Thymoqunone treatment of intracytoplasmic sperm injection(ICSI) compared to in vitro fertilization(IVF) of mice oocytes and their development in vitro. Adv.Mol.Med.1(3):119-123. www.advmolmed.com

-Austin C.R. and Short R.V. (1982): Reproduction in Mammals, Book 2"Embryonic and Fetal Development "2nd ed. Cambridge University press.Cambridge.UK.

Daniel J. (1971): Methods in Mammalian Embryology. Freeman and Co. USA.

Hamburger V. and Hamilton H.L (1951): A series of normal stages in the development of chick embryo.J.Morphol. 88:49-92.

Harrison B.M. (1977): Embryology of the chick and pig . Dubuque W.M.C.Brown company .

Heiser William C. (2004): Gene Delivery to Mammalian Cells.Methodes in molecular biology. Vol.245. Human prss Totowa, New Jersey.USA.

Hosseini, S.M. F. Moulavi, M. Foruzanfar, M. Hajian, P. Abedi[a], M. Rezazade-Valojerdi, K. Parivar, A.H. Shahverdi and M.H. Nasr-Esfahani (2008)? Effect of donor cell type and gender on the efficiency of in vitro sheep somatic cell cloning J.Small rumres.vol 6:4

New D.A.T. (1964): The Culture of Vertebrate Embryology London .Logos press.

Paul John(1975): Cell and Tissue Culture. 5th ed. Churchhill Livingston.

Rugh, R. (1956): Laboratory Manual of Vertebrate Embryology. Minneapolis, Burgess.Press

Rugh, R. (1962): Experimental Embryology. Minneapolis, Burgess. Press

Rugh, R. (1968): The Mouse: Its reproduction and development. Minneapolis, Burgess.Press.

الملحق

مقترح من أحد المحكمين للكتاب

فئران المعامل

• تُعتبر الفئران من أشهر الحيوانات المستخدمة في التجارب المعملية في البيولوجي وعلم النفس لأنها من الثدييات كما أنها تشترك بدرجة كبيرة في التشابه مع الإنسان.

• كما أن الفئران تستخدم كنموذج للثدييات أكثر من الجرذان في بعض الحالات.

• وقد تم ترتيب وتتبع البنية الوراثية (الجينية) للفأر، حتى أصبح بالفعل يوجد مثيلات (نظائر) لجميع جينات الفأر في الإنسان.

• الفئران صغيرة الحجم قليلة التكلفة رعايتها سهلة ويمكنها التناسل بسرعة، حتى أنه يمكننا الحصول على عدة أجيال متتالية في فترة قصيرة من الوقت.

• يعتبر فأر المعمل سهل الانقياد وسهل التعامل معه.

Laboratory mice

• Mice are common experimental animals in biology and psychology primarily because they are mammals.

• Mice also share a high degree of homology with humans.

• They are the most commonly used mammalian model organism, more common than rats.

• The mouse genome has been sequenced, and virtually all mouse geues have human homologs.

• They can also be manipulated in ways that would be considered unethical to do with humans.

• Mice are small, inexpensive, easily maintained, and can reproduce quickly.

• Several generations of mice can be observed in a relatively short period of time.

• The laboratory mouse is a docile animal and can be easily handled.

العناية الأساسية

• توضع الفئران في أقفاص مصنعة من البولي كربونات ولها غطاء من السلك.

• يوضع الفراش في القفص يسمح بامتصاص البول ويسمح للفئران بعمل أوكار لها.

• يحتوي القفص على ٤ – ٥ فئران بالغة، ويفضل أن تكون الأقفاص في مكان جيد التهوية.

• تزود الفئران بالماء بواسطة جهاز مكون من حلمات لها صمامات خاصة يوجد داخل الصندوق.

• توضع الأقفاص في ١٢ ساعة ضوء و١٢ ساعة ظلام حيث إن هذا النظام مهم في عملية التناسل.

Basic Husbandry

• Most mice are housed in shoebox cages composed of polycordnate material with a wire bar lid.

• Bedding is placed directly into the box cage allowing the absorption of urine and the animal to burrow and / or den.

• This cage will hold 4-5 adult mice depending of the size of the cage.

• Majority of mice are housed in ventilared racks which supply filter sterilized air.

• Water is frequently supplied by and automatic watering system, which is supplied by a nipple valve (i.e. lixit) located in the back of the cage that is operated by animal contact.

• The water provided to animals is chlorinated tap water.

• Light cycles are important in breeding mice and are provided with 12 hours of light and 12 hr. of dark. Deviations from this cycle will effect reproductive performance.

التعامل مع الفئران

• عند التعامل مع الفئران لابد من ارتداء القفاز لمنع حدوث الحساسية من الفئران.

• تمسك الفئران عادة وترفع من الذيل.

• يمسك الذيل من المنطقة بين منتصفه والجسم.

• يمسك الذيل بواسطة إصبع الإبهام والإصبع الأول أو بواسطة ملقط ذي نهاية ملساء (ناعمة).

• بهذه الطريقة البسيطة في إمساك الفأر يمكن نقله إلى قفص آخر أو وضعه على الميزان، أو تعريفه أو تعيين جنسه.

• يمكن أيضاً إمساك الإناث الحوامل بهذه الطريقة ولكن نساعد ذلك بوضع اليد الأخرى تحت أقدام الحيوان.

• لمزيد من التحكم في الفأر يتم إمساكه من الذيل ويوضع على منضدة أو أي سطح (مثل غطاء القفص) وإمساك الفأر من الجلد (اللين أو الفضفاض) الذي يغطي العنق والكتفين بواسطة إصبع الإبهام والأصابع الأخرى، وهذه الطريقة ضرورية لمنع الفأر من محاولة القيام بالعض، وبذلك تكون رأس الفأر تحت السيطرة.

• من المهم جداً عدم إسقاط الفأر في القفص (لكي لا يتسبب ذلك في كسر العمود الفقري) ولكن يوضع برفق على فراش القفص.

• يتم إمساك الصغار في أسبوعين من الجلد اللين فوق العنق والكتفين بواسطة الإبهام والأصابع أو باستخدام ملقط أملس الطرفين.

• يجب تجنب إمساك الفئران حديثي الولادة وخصوصاً في خلال الأيام القليلة بعد الولادة، حتى لا تلتهم الفئران هذه الصغار أو تهجر الإناث صغارها.

• إذا كان من الضروري إمساك هذه الصغار فيجب وضع الأم في قفص آخر واستعمال قفاز في إمساك الصغار حتى لا تختلط رائحة الإنسان بالصغار.

Handling and Restraint

• When handling mice it is advisable to wear gloves to prevent the development of allergies due to direct contact with animal allergens.
• Mice are usually caught and lifted by the tail.
• The tail should be grasped between its midpoint and the mouse's body.
• The tail may be grasped with the thumb and forefinger or by the used of smooth-tipped forceps.
• With this simple method of holding, they may be transferred to another cage, a balance, identified, examined casually or sex may be determined.
• Pregnant mice may be handled by this method but they should be supported by use of the second hand placed should be supported by use of the second hand placed under their feet.

• For more effective control, the mouse may be held by the tail and placed on a table or other surface, (preferably one such as a wire cage lid that the mouse can grasp) and the loose skin over neck and shoulder grasped with thumb and fingers. It is necessary to perform this maneuver expeditiously, or the mouse may turn and bite.
• Once the mouse is grasped correctly, the head is adequately controlled.
• Mice should not be dropped into the cage, which may result in spinal fracture, but should be lowered into the cage and released up on contact with the bedding.
• Mice less than two weeks of age can be handled by grasping the loose skin over the neck and shoulder with thumb and finger or smooth tipped forceps.
• Handling neonatal mice should be avoided especially during the first few days after birth to avoid cannibalism or litter abandonment. If it is necessary to handle the litter, remove the dam to a separage cage and handle the neonates using plastic gloves to avoid contamination with human scent.

التغذية

• الفئران عشبية حيث تتغذى في الطبيعة على أي نوع من الفاكهة والحبوب من النباتات.
• أما في العمل فيتم تغذيتها على غذاء تجاري (طبيعي) على هيئة كريات صغيرة تتكون من الحبوب مضافاً إليه بروتين وفيتامينات ومعادن.
• يحتاج الفأر إلى حوالي ١٥ جم من الغذاء يومياً لكل ١٠٠ جم من وزن الجسم. كما يحتاج إلى حوالي ١٥ مل من الماء يومياً لكل ١٠٠ جم من وزن الجسم.

Nutrition
• In nature, mice are herbivores, consuming any kind of fuit or grain from plants.
• In captivity, mice are commonly fed commercial pelleted natural ingredient diets, composed primanily of ceral grains which are supplemented with additional protein, vitamins and mineral.
• Food intake is approximately 15 gm per 100 gm of body weight per day. Water intake is approximately 15 ml per 100 gm body weight per day.

التناسل

• تبدأ الفئران التناسل في عمر مبكر، فكلا الجنسين يبدأ التناسل في عمر ٦ أسابيع ويستمر التناسل حتى عمر عام.

• لا بد من مراعاة قاعدة بسيطة وهي "فأر ذكر واحد لكل قفص" وجود عدة ذكور في قفص واحد مع الإناث يؤدي إلى اقتتالهم معاً فيموت بعضهم، كما أنهم يحدثون إصابات بالإناث، كما يؤدي ذلك إلى قتل الصغار.

• معظم الفئران تنتج التناسلية (النزوية) ويمكنها التناسل طوال العام. وتستمر هذه الدورة من ٤ – ٥ أيام.

• يتم التزاوج عادة في الليل ويمكن التأكد من إتمامه بوجود السدادة المهبلية (سدادة التزاوج) في المهبل في خلال ٢٤ ساعة بعد التزواج.

• متوسط فترة الحمل هي ٢٠ يوماً.

• تزن الصغار (حديثي الولادة) حوالي ٠,٥– ١,٥ جم، وتكون غير مغطاة بالشعرة ومغلقة الأعين والأذن.

• يتم فطام الصغار في عمر ٣ أسابيع ويكون وزنها ١٠ – ١٢ جم.

التعرف على جنس الفأر

• يمكن التميز بين الذكر والأنثى بواسطة المسافة بين فتحة الشرج والحلمة التناسلية حيث إن هذه المسافة أكبر في حالة الذكر. وهذا الفرق موجود أيضا في الفئران حديثة الولادة.

Reproduction (Breeding)

• Mice can start reproducing at an early age. Both sexes can start breeding at 6 weeks of age and continue until they are alout 12 months old. There is a simple rule, that is " only one malc to a cage " multiple males will fight and can kill each male to a cage " multiple males will fight and can kill each other. Multiple males cause damage to females and often kill the babies that re produced. Most mice produce small litters of about 3 to 12 babies (every 18-28 days). Mice are polyestrous and breed year round; ovulation is spontaneous The duration of the estrous cycle is 4-5 days and estrus itself lasts about 12 hours, occurring in the evening.

• Mating is usually nocturnal and may be confirmed by the presence of a copulatory (vaginal) plug in the vagina up to 24 hours post – copulation.

• The average gestation period is 20 days.

• The youngs are called pups and weigh 0.5-1.5 gm at birth, are hairless, and have closed eylids and ears.

• Pups are weaned at 3 weeks of age, weaning weight is 10-12 gm.

Mice Sexing

• Male and female mice can be differentiated by the distance from the anus and genital papilla which is greater in males. This difference is also present in neonatal mice.

إرشادات للعمليات الجراحية للقوارض الحية

• تستعمل حجرة خاصة نظيفة للعمليات المعقمة.
• تُستخدم قماش أو جوخ على السطح المستخدم للجراحة.
• استعمال أدوات وتجهيزات كلها معقمة وكذلك المواد المستخدمة في غلق (خياطة) الجرح.
• لا بد أن يتأقلم الحيوان بالمكان قبل الجراحة بحوالي ٤٨ ساعة.
• يُزال الشعر من فوق موقع الجراحة (باستخدام مساكات شعر).
• يستعمل الجراح والمساعدون قفازات معقمة، أقنعة جراحية.
• يجب أن لا تلمس القفازات والأدوات المعقمة أية أشياء غير معقمة.
• يجب العناية بالحيوان بعد الجراحة حيث تتم تدفئته إثناء فترة النقاهة يمكن ذلك بوضع زجاجة ماء ساخن أو يملأ قفاز بماء دفيء بجانب الحيوان.
• في حالة فقد الحيوان لسوائل الجسم خلال النزيف أو الجفاف أثناء الجراحة، يعطي الحيوان محلول دافئ معقم تحت الجلد.
• يجب تسجيل ما يلي بعد الجراحة:

التاريخ، تعريف الحيوان، التقنية المستخدمة في الجراحة، الأدوية والجرعات وطريقة إعطائها وقت التماثل للشفاء، إعطاء مسكنات تاريخ، إزالة الخياطة أو اختفائها.

Guidelines for Rodent Survival Surgery

• Clean, separate room used primarily for aseptic procedures.
• A sterile drop be applied over the surgery surface.
• Use of sterile instruments, supplies and wound closure materials.
• Use a health rodent.
• A 48- hour acclimation period for the animal before surgery.
• Hair must be removed from the surgical site (using hair clippers).
• Surgical mask and sterile gloves must be worn by the surgeon and assistants.
• To maintain sterility during the surgery, sterile gloves or instruments must not contact any thing that has not been sterilized.
• Postsurgical care is recommended; providing warmth during recovery. A hot water bottle or latex glove filled with warm water can be placed next to the reconvening animal.
• Analgesics should be administered during the 24 hours postoperatively.

• The following must recorded post surgically: date, animal identification, technique performed, drug/ dose/ route, time of induction, time of recovery, analgesia administration, date of removing sutures or are no longer present (when survival is longer than 14 days).

التعقيم

• الطريقة المفضلة للتعقيم هي باستخدام المعقام (أو توكليف) وهو جهاز معدني محكم القفل يستخدم للتعقيم بواسطة البخار المحمي والضغط (أي الحرارة العالية مع الضغط). ولابد أن يتخلل البخار جميع الأدوات بالعلبة (داخل الجهاز).

• يتم التعرض في هذا الجهاز حوالي ١٣ دقيقة في درجة حرارة ١٢١ °م.

* عند نهاية التعقيم تحفظ الأدوات في مكان جاف خالي من الأتربة، جيد التهوية ويفضل في دولاب مغلق أو حجرة خاصة.

Sterilization

• The preferred method of sterilization is high pressure / temperature (in autoclaves), for items that can withstand high temperature.

• An autoclave utilizes saturating steam at high heat and pressure to attain sterilization, steam must penetrate the pack completely.

• Exposure tine time in an autoclave is normally 13 minutes at 121C°.

• Once the pack has been autoclaved, it can stored until use in a dry, dust-free, well ventilated area, preferably in a closed cabinet.

إعطاء الفئران السوائل والأدوية

أ) خلال الجهاز الهضمي (المعدة والأمعاء):

١- عن طريق الفم:

• من الممكن إعطاء بعض المواد بإضافتها إلى الطعام أو ماء الشرب.

• تؤثر الأحوال البيئية (مثل درجات الحرارة المحيطة بالحيوان) في قدرة الحيوانات على استهلاك الطعام والماء.

• كقاعدة عامة يستهلك الفأر البالغ حوالي ١٥ جم من الطعام و١٥ لم من الماء يومياً لكل ١٠٠ جم من وزن الجسم.

٢- التغذية الأنبوبية:

• عندما يكون من الضروري إعطاء كميات محدده من المادة، فإننا نستخدم المحقن لإدخالها إلى المعدة، يتم ذلك غالباً بدون تخدير.

• التغذية بالمحقن الذي يحمل في طرفه كرة صغيرة يمنع دخول المحقن إلى القصبة الهوائية كما يمنع جرح التجويف الفمي.

• يتم إدخال محقن التغذية خلال الفم إلى المعدة ثم المرئ، مع الحرص على ألا تدخل الأنبوبة في القصبة الهوائية وألا تثقب المرئ أو المعدة.

• تتم هذه العملية بإمساك الفأر باليد ويتم إدخال المحقن في الفراغ الموجود بين القواطع والطواحن (الفرجة).

• وعندما يصل المحقن (الأنبوبة) إلى البلعوم فإن الفأر عادة يبدأ في ابتلاع المادة لتدخل إلى المرئ.

ب) الإعطاء بالحقن:

• خلال الأوردة: مباشرة إلى الجهاز الدوري خلال أحد الأوردة.

• خلال الشرايين: مباشرة إلى الجهاز الدوري خلال أحد الشرايين.

• داخل التجويف البريتوني: مباشرة إلى التجويف البطني.

• تحت جلدي: تحت الجلد.

• في العضلات.

• يجب على الباحث أن يكون لديه معلومات عن الخواص الفسيولوجية والكيميائية للمادة التي يتم حقنها.

• ومن أفضل الأماكن في الجسم لحقن مولدات الأجسام المضادة هي تحت الإبط، جدار الصدر الجانبي وعضلات الجسم الكبيرة.

خلال الأوردة:

الأدوات: إبرة سعة ٢٧-٣٠ محقنة ١ مل، ماسك للفأر، مصباح للتدفئة.

الحجم: للفئران البالغة: لا يتعدى ٢ مل.

• يستخدم لهذا الحقن الأوردة الذيلية.

• يغمس الذيل في الماء الدافئ أو يتم تدفئة الفأر.

• يمكن رؤية هذه الأوردة برفع الذيل ودورانه قليلاً في كلا الاتجاهين.

داخل التجويف البريتوني:

• الأدوات: محقنة وإبرة سعة ٢٣-٢٧ بوصة.

الحجم: للفئران البالغة: لا تتعدى ٢ مل.

• يمسك الفأر وتوجه الرأس إلى أسفل.

• يتم الحقن في جانب الربع السفلي الأيسر من البطن.

تحت جلدي

الأدوات: محقنة وإبرة سعة ٢٥- ٢٧، ٠,٥ — ٣,٤ بوصه

الحجم: للفئران البالغة: لا تتعدى ٧ — ٣ مل

• يستعمل للحقن بهذه الطريقة الجلد اللين بين الكتفين، وكذلك يمكن استخدام جلد البطن.

• يتم غرز الإبرة وإدخالها في الجلد وتتقدم ٥ إلى ١٠ مم خلال النسيج تحت جلدي حتى لا يحدث إرتشاح (تسرب) للسائل من موقع الحقن.

في العضلات:

الأدوات: محقنة و إبرة سعة ٢٦-٣٠ و ٠,٥ بوصة.

الحجم: للفئران البالغة، لا تتعدى ٠,٠٥ مل

• يستعمل لذلك عضلات الرجل والظهر.

• هذه الطريقة لا تستعمل عادة وذلك لصغر كتلة العضلات وخطورة الإضرار بالأنسجة الحية.

تجميع (مصل) الدم.

• تغرز الإبرة موازية للوريد ويكون رأسها (طرفها) متجه داخل تجويف الوريد على طول المحور الطولي للوريد.

• يتم سحب (شفط) الدم ببطء حتى لا ينطوي (يتضرر ويضعف) الوريد.

• يتم تنظيف موقع الحقن بالكحول.

• يغمس الذيل في ماء دافيء حتى تتسع الأوردة.

١- ثقب الوريد الذيلي في الفئران:

الأدوات: سلاح مشرط، إبرة سعة ٢٥ — ٣٠ مل.

• يمكن تجميع عينة صغيرة من الدم (قطرات قليلة) بالخاصية الشعرية باستعمال أنبوبة جهاز تعيين محتويات الدم، مزودة بإبرة سبق إدخالها في وريد الذيل تستعمل هذه الطريقة لحساب نسبة الهيموجلوبين وتعيين بلازما الدم وخلايا الدم وعد الدم.

• أما العينات الكبيرة من الدم فيمكن الحصول عليها بعمل شق (جرح) فوق الأوعية الدموية باستعمال سلاح المشرف ويمكن سحب حوالي ١,٥ مل من الدم ولابد من استعمال مخدر.

٢- ثقب القلب:

الأدوات: إبرة سعة ٩ -٥ مم.

• هذه الطريقة خطرة على الحيوان ومن الممكن أن تسبب الموت.

• تغرز الإبرة تحت الغضروف السيفي وقليلا إلى اليسار من الخط المنصف للجسم. ثم تتقدم الإبرة بزاوية من ٢٠ إلى ٣٠ درجة من المحور الأفقي حتى تصل إلى القص ثم تدخل القلب.

• لا بد أن يسحب الدم ببطء (لا يتعدى ١ مل).

٣- ثقب الجيب الدموي في محجر العين:

الأدوات: أنابيب شعرية.

• يتم تجميع حوالي ٠,٢٥ مل من الدم أسبوعياً.

• يتم إدخال الأنبوبة في الجيب الدموي الذي يحيط بكرة العين، في المنطقة عند التقاء الجفن العلوي بالسفلي وتوجه للخلف وقليلاً إلى الناحية الظهرية.

• بعد سحب الدم يتم الضغط على المنطقة لمنع تكون ورم (تجمع) دموي.

• يجب استخدام مخدر.

Administration of fluids and drugs

(A) Gastro – intestinal tract:

(1) Oral:

• Substances may be administered by addition to the food or the drinking water.

• Environmental condition such as the ambient temperature affect both water and food consumption.

• As a general rule, 15 ml of water and 15 gm of food will be consumed daily per 100 gm of body weight.

(2) Gavage:
• If necessary to administer exact amounts of a substance, gastric feeding needles should be used.
• Entry normally may be obtained without anesthesia using hand restraint.
• Feeding needles with a ball tip helps prevent introduction of the needle into the trachea and perverts trauma to the oral cavity.
• Feeding needles are inserted through the mouth into the stomach or lower oesophagus.
• Care must be taken that the tube or needle does not enter the trachea or puncture the oesophagus or stomach.
• With the mouse restrained in one hand, the feeding needle is introduced in the space between the incisors and the beginning of molars (diastema).
• As the needle approaches the pharynx, the mouse will usually swallow allowing introduction into the oesophagus.
• With the stomach tube fitted to a syringe or aspirator, materials may be adminstred or withdrawn as required.

(B) Parenteral administration (Injection):
• intravenous (iv): directly into the vascular system through a vein.
• Intra-arterial (ia): directly into the vascular system through an artery.
• Intraperitoneal (ip): into the abdominal cavity.
• Subcutaneous (sc): under the skin.
• Intramuscular (im: into a muscle.
• Intradermal (id): between layers of skin.
• The investingator should know the physiological and chemical properties of the substance injected.
• Suitable sites for antigen injections are subcutaneously in the axilla or lateral thoracic wall, or deep in large muscle masses.

Intravenous:
Equipment: 27-30g needle, 1 ml tuberculin syringe, mouse holder, warming lamp.
Volume: for adult: not exceed 0.2 ml.
• The lateral veins of the tail are used.
• The tail is immersed in warm water or the mouse is warmed.
• The veins can be seen when the tip of the tail is lifted and rotated slightly in either direction.
Intraperitoneal:
Equipment: syringe and 23 to 27g, 0.5 to 1 inch needle.
Volume: for adult, not exceed 2 ml.
• The mouse is grasped, head – down position.
• Injection is made in the lateral aspect of the lower left quadrant.
Subcutaneous:
Equipment: Syringe and 25 to 27g, 0.5 to 3.4 – inch needle.

Volume: for adult, not exceed 2-3 ml.

- The loose skin between the shoulder blades in usually used.
- The vental abdomen is also used.
- The needle is inseted through the skin and advanced 5 to 10 mm through subcutaneous tissue to prevent lea kage from the site.

Intramuscular:

Equipment: Syringe and 26 to 30g, 0.5 – inch needle.

Volume: for adult, eot exceed 0.05 ml.

- Back and hind leg muscles are used.
- This route is usually not used, because of the small muscle nass available and the danger of damaging vital structures.

Blood collection:

- The needle inserted parallel to the vein and the tip directed into the lumen along the longitudinal axis.
- When withdrawing blood from a vein, aspiration should be slow so the vessel does not collapse.
- The area of injection or incision should be cleaned with alcohol.
- The tail is immersed in warm water to veins dilation.

(1) Tail vein venipuncture in mice:

Equipment: scalpel blade, 25-30 g needle.

- A small blood sample (a few drops) may be collected by capillary action using a microhematocrit tube inserted into a small needle previously placed into the tail vein. This method is adequate for hemoglobin, microhematocrit and cell count.
- Larger blood samples can be obtained by making a small incision over the vessels using a scapel blade.
- 0.5 to 1 ml of blood can be withdrawn; anesthesia should be used.

(2) Cardiac puncture:

Equipment: 0.90 to 0.50 mm needle.

- This method carries considerable risk to the animal and occasionally deaths occur.
- Animals must be anesthetized.
- The needle is inseted under the xyphoid cartilage slightly to the left of midine. The needle is advanced to a 20 to 30 degree angel from the horizontal axis to the sternum to enter the heart.
- Blood should be withdrawn slowly (up to 1 ml).

(3) Orbital sinus venipuncture:

Equipment: capillary tubes.

- 0.25 ml of blood can be collected weekly.
- Bleeding requires that the tube be directed into the orbital sinus which surrounds the globe.
- The tube is insered into the medial canthus of the eye and directed caudally and slightly dorsally.
- Pressure should be applied after blood collection to prevent hematomas.
- Anesthesia is required.

ثبت المصطلحات

أولاً: عربي – إنجليزي

أ

إبر الحقن المجهري	Micropipitty injection needle
أجنة الضفادع	Frog embryos
الأجنة التجريبي	Experimental Embryology
الإخصاب	Fertilization
الإخصاب الأصطناعي الخارجي	*In vitro* fertilization
الذيليات	Urodela
اللاذيليات	Anura
إزالة اللون	Decoloration
إزالة للتمايز الخلوي	Dedifferentiation
الإسالة (التدفئة)	Thowing
الأسبرين	Aspirin
استنساخ أجنة الأغنام	Sheep embryo cloning
أشعة فوق بنفسجية	UV-light

Light	الإضاءة
Redifferentiatio	إعادة للتمايز الخلوي
Ovens	الأفران
Bovine serum albumin BSA	ألبيومين سيرم العجل
Micropipettes	الأنابيب الدقيقة
Holding micropipette.	أنبوبة الحمل الدقيقة
Cutting micropipette	أنبوبة القطع الدقيقة
Pronase	إنزيم البرونيز
Trypsin enzyme	إنزيم التربسين
Hyaluronidase.	إنزيم الهايلورونديز
Exogastrolation.	الإنغماد أو تبطين للخارج
Ampulla	الأمبولة
Hair loop	الأنشوطة الشعرية

ب

Anura	البرمائيات اللاذيلية
Exencephaly	بروز المخ للخارج في الأجنة
In vitro maturation medium IVM	بيئة إنضاج البويضات
M2 medium	بيئة إم ٢
M16 medium	بيئة إم ١٦
Ionomycin.	بيئة الأينوميسين
Potassium simple optimize medium.KSOM	بيئة البوتاسيوم المتوازنة

بيئة تنمية أجنة البرمائيات	Culture medium of frog embryo
بيئة دلبيكو ايجل	Dulebeccos modified eagles medium.(DMEM)
بيئة زراعة الخلايا الليفية	RPMI medium
بيئة زراعة الخلايا الجذعية الجنينية	Embryonic stem cell culture medium.ES
بيئة قناة البيض المحضرة	Synthetic oviduct fluid medium (mSOF)
بيئة هام ف ١٠	Ham-F-10 medium

ت

التبطين إلى الخارج	Exogastrulation
التتراسيكلين	Tetracycline
التثبيت	Fixation
التجدد	Regeneration
تجميد الحيوانات المن	Cryopreservation of sperm
تجهيز الخلايا الجس	Somatic cell preparation.
التحول اليرقي	Metamorphesis
الترويق	Clearing
التشوهات الخلقية	Congenital malformations
التقطيع	Sectioning
تمرير الخلايا الجذعية	Stem cell passage
تنشيط التبويض	Super ovulation
تهوية صناعية	Artificial aeration



الثقب الكبير للجمجمة	Foramen magnum.
ثقب المفلجة	Blastopore
ثنية الرأس	Dead fold



الجرعة	Dose
الجسم الجنينى	Embryonic body cells
جمع الأجنة	Embryo collection.
جمع البويضة	Ova collection
جمع الحيوانات المنوي	Sperm collection
جهاز الدمج الخلوي	Electro cell fusion.
جهاز تحليل السائل المنوي	Semen Analyzer
جهاز تعقيم البيئات	Autoclaves
جهاز التقطيع	Microtome
جهاز تشكيل الأنابيب الدقيقة	Micro-forge
جهاز الحفظ بالتجميد	Freezing Preservation equipment
جهاز الحقن المجهر	Micromanpulatore
جهاز الدقاق (لفتح ثقب في الغشاء الشفاف)	Peizo injector
جهاز سحب الأنابيب الدقيقة	Micropipettes puller
جهاز سن الأنابيب الدقيق	Micropipettes grinder
جهاز طرد مركزي	Centrifuge
جهاز قياس الأس الهيدروجينى	pH meter

ح

الحاضنات	Incubators
الحاقن الدقيق	Microinjector
الحامل الدقيق	Micropipette holder
حاوية التبريد	Bio cell deep freezing
الحث الجنيني	Embrvonic Induction
حث عملية التبويض	Induced spawning
الحرارة	Temperature
حضان	Incubator
حفظ العينات	Sample preservation
حقن مجهري	Microinjection
الحمام المائي الساخن	Water hot bath
حيوانات عاشبة	Herbivorous

خ

خصي ذكور الفئران	mice male Vasectomy
الخلايا الجذعية الجنينية	Embryonic stem cells ESC.
خلايا النسيج الغذائي	Trophoblast cells
خلايا مغذية	Feeder cells
الخياشيم	External gills

د

دمج الأجنة	Chimera
الدمج الخلوي	Cell fusion.
الدورة التناسلية أو الشبق	Estrous cycle
دولاب أو كابينة التعقيم	laminar flow hood

ذ

ذكر مخصي	Vasectemized male

ر

رطوبة نسبية	Relative humidity

ز

زراعة الخلايا الليفية	Fibroblast cell culture
زيت خشب السيدر	Cedar wood oil
الزيت المعدني	Mineral oil

س

سخان الشرائح	Slides wormer or Hot plate
السدادة المهبلية	Vaginal plug
سلالة الفئران	Balb/c , C57/6J , DBA
سيرم دم العجل البقري	Fetal calf or Bovine serum FCS BSA
سيتوكلايسين - ب	Cytochalsin B

ش

Potassium alaum	الشب البوتاسي
Hemocytometcr	شريحة العد الزجاجي
Dorsal lips	الشفة الظهرية

ص

Alcoholic eosin	صبغة الأيوسين الكحولية
Borax carmine stain	صبغة بواركس الكارمين
stain Hoechst	صبغة هتش الفلورسنتية
Ehrlich's haematoxylin.	صبغة الهيماتوكسلين
Hematin stain	صبغة الهيماتين

ض

Rana frog	ضفدعة من جنس رانا

ط

Embedding	الطمر
Two cell stage	طور الخليتين

ع

Space and aeration factor	عامل المكان والتهوية
Basioccipital bone	العظم القذالي القاعدي

غ

Pituitary gland	الغدة النخامية
Vitelline membrane	الغشاء المحي

ف

فترة الكمون (دورة الخلية) G0 الفئران المخبرية	Laboratory mice.
الفراغ اللمفي الظهري	Dorsal lymphatic space.
فصل العمود الفقاري عند الرقبة	Cervical dislocation.
نزع الماء	Dehydration

ق

قبل الشبق	Proestrous
القرص الجرثومي	Balstoderm

ك

كابينة زراعة خلايا	Cell culture hood
كتلة الخلايا الداخلية	Inner cell mass ICM
كثافة مستعمرة الخلايا الجذعية	ES confluent condition.
كندا بلسم	Canda balsam
الكلوريتون المخدرة	Chloretone
كيتامدور (مادة مخدرة)	Ketamador

ل

لاحمة التغذية	Carnivorous.

م

مادة المتومسين س	Mitomycine –c MMC

Glass pipette	ماصات السحب الزجاجية
Micropipettes.	الماصات الدقيقة
Gastrula	المبطنة (الجاسترولة)
Complement of anti mouse serum	متمم أو مكمل مضاد السيرم
Omnivorous	متنوعة التغذية
Pannet-compton saline solution	مثبت بانت كومبتون الملحي
Heidenhein susa fixative	مثبت هيدنهن سوسا
Original ringer solution	محلول رنجر الأصلي
Raffinos.	محلول الرفينوس
Steinbert's solution	محلول شتاين بيرت
Phosphate buffer solution PBS	محلول الفوسفات المتعادل
Locke's solution	محلول لوك الفسيولوجي
Isotonic solution	محلول متساوي التوتر
Hypotonic solution	محلول منخفض التوتر
EDTA (Ethyl Dimethyl tetra acetic)	محلول منظم ايدتا
Vehicle	المحلول المذيب
Standard Holtfreters solution	محلول هولتفرتر القياسي
Lugol solution	محلول لوجول
Dissecting Microscope	المجهر التشريحي
Inverted microscope	مجهر مقلوب العدسة
Micromanipulator	مجهر المعالجات الدقيقة

المخ الخارجي	Exencephaly.
المرشحات	Filters
مرحلة التئام الجرح	Wound healing stage.
مرحلة البتر	Amputation stage.
مرحلة الشبق	Estrus
مرحلة ما بعد الشبق	Metestrus.
مرحلة نهاية الشبق	Diestrus
مضاد سيرم الفأر	Rabbit-anti mouse-spleen serum.
المعقمات الحرارية	Heater Autoclaves.
المفلجة المتأخرة	late blastula.
الموازين	Balances.
المنطقة القذالية	Occipital region.
المنطقة الوعائية	Vascular area
المنظمات الجنينية	Embryonic Organizers

ن

نبات الأيلوديا والنتلا	Elodea and Nitella
نزع الماء	Dehydration
نقل الأجنة	Embryo transfer
نقل الأجنة بعملية جراحية	Surgical embryo transfer.
النقل النووي	Nuclear transfer



الهايكونسيل	Hiconcil.
هرمون البروستا جلاندين	Prostaglandin.
هرمون الجسم الأصفر	Luteinizing hormone (LH).
هرمون سير الفرس الحامل	Pregnant mare serum gonadotropine PMSG
الهرمون المحفز لنمو الحويصلات	Follicle stimulating hormone (FSH).
الهرمون المشيمي التناسلي أو البشري	Human chorionic gonadotrophin (hCG)

ثانياً: إنجليزي – عربي

A

Alcoholic eosin	صبغة الأيوسين الكحولية
Ampulla	الأمبولة
Amputation stage.	مرحلة البتر
Anura	البرمائيات اللاذيلية
Aspirin	الأسبرين
Artificial aeration	تهوية صناعية
Autoclaves	جهاز تعقيم البيئات

B

Balances	الموازين
Basioccipital bone	العظم القذالي القاعدي
Bio cell deep freezing	حاوية التبريد للخلايا
Balstoderm	القرص الجرثومي
Blastopore	ثقب المفلجة
Borax carmine stain	صبغة بواركس الكارمين
Bovine serum albumin BSA	ألبيومين سيرم العجل

C

Canda balsam	كندا بلسم
Carnivorous	لاحمة التغذية
Cedar wood oil	زيت خشب السيدر

Cell culture hood	كابينة زراعة خلايا
Cell fusion	الدمج الخلوي
Centrifuge	جهاز طرد مركزي
Cervical dislocation	فصل العمود الفقاري عند الرقبة
Chimera	دمج الأجنة
Chloretone	الكلوريتون المخدرة
Clearing	الترويق
Complement of anti mouse serum	متمم أو مكمل مضاد السيرم
Congenital malformations	التشوهات الخلقية
Cryopreservation of sperm	تجميد الحيوانات المنوية
Cutting micropipette	أنبوبة القطع الدقيقة
Cytochalsin B	سيتوكلايسين- ب

D

Decoloration	إزالة اللون
Dedifferentiation	إزالة للتمايز الخلوي
Dehydration	نزع الماء
Diestrus	مرحلة نهاية الشبق
Dissecting Microscope	المجهر التشريحى
Dorsal lips	الشفة الظهرية
Dorsal lymphatic space	الفراغ اللمفى الظهري
Dose	الجرعة
Dulebeccos modified eagles medium (DMEM)	بيئة دلبيكو ايجل

E

Ehrlich's haematoxylin	صبغة الهيماتوكسلين
Electro cell fusion	جهاز الدمج الخلوي
Elodea and Nitella	نبات الأيلوديا والنتلا
Embedding	الطمر
Embryo collection	جمع الأجنة
Embryonic body cells	الجسم الجنيني
Embrvonic Induction	الحث الجنيني
Embryonic Organizers	المنظمات الجنينية
Embryonic stem cells ESC	الخلايا الجذعية الجنينية
Embryonic stem cell culture medium ES	بيئة زراعة الخلايا الجذعية الجنينية
Embryo transfer	نقل الأجنة
ES confluent condition	كثافة مستعمرة الخلايا الجذعية
Estrous	مرحلة الشبق
Estrous cycle	الدورة التناسلية أو الشبق
Ethyl Dimethyl tetra acetic (EDTA)	محلول منظم ايدتا
Exencephaly	بروز المخ للخارج في الأجنة
Exogastrulation	الإنغماد أو تبطين
Experimental Embryology	الأجنة التجريبي
External gills	الخياشيم الخارجية

F

Feeder cells	خلايا مغذية
Fetal calf or Bovine serum FCS BSA	سيرم دم العجل البقري
Filters	المرشحات
Fertilization	الإخصاب
Fibroblast cell culture	زراعة الخلايا الليفية
Fixation	التثبيت
Follicle stimulating hormone (FSH)	الهرمون المحفز لنمو الحويصلات
Foramen magnum	الثقب الكبير للجمجمة
Freezing Preservation equipment	جهاز الحفظ بالتجميد
Frog embryos	أجنة الضفادع

G

G0	فترة الكمون (دورة الخلية)
Gastrula	المبطنة (الجاسترولة)
Glass pipette	ماصات السحب الزجاجية

H

Hair loop	الأنشوطة الشعرية
Ham-F-10 medium	بيئة هام ف ١٠
Dead fold	ثنية الرأس
Heater Autoclaves	المعقمات الحرارية
Heidenhein susa fixative	مثبت هيدنهن سوسا

Hematin stain	صبغة الهيماتين
Hemocytometer	شريحة العد الزجاجية
Herbivorous	حيوانات عاشبة
Hiconcil	الهايكونسيل
Holding micropipette	أنبوبة الحمل الدقيقة
stain Hoechst	صبغة هتش الفلورسنتية
Human chorionic gonadotrophin.(hCG)	الهرمون المشيمي التناسلي أو البشري
Hyaluronidase	أنزيم الهايلوروندیز
Hypotonic solution	محلول منخفض التوتر

I

Incubator	الحضان
Induced spawning	حث عملية التبويض
Inner cell mass ICM	كتلة الخلايا الداخلية
Inverted microscope	مجهر مقلوب العدسة
In vitro fertilization	الإخصاب الأصطناعي الخارجي
In vitro maturation medium IVM	بيئة إنضاج البويضات
Ionomycin	بيئة الأينوميسين
Isotonic solution	محلول متساوي التوتر

K

Ketamador	كيتامدور (مادة مخدرة)

L

Laboratory mice	الفئران المخبرية
laminar flow hood	دولاب أو كابينة التعقيم
late blastula	المفلجة المتأخرة
Light	الإضاءة
Lithium carboniat	كربونات الليثيوم
Locke's solution	محلول لوك الفسيولوجي
Lugol solution	محلول لوجول
Luteinizing hormone (LH)	هرمون الجسم الأصفر

M

M2 medium	بيئة إم ٢
M16 medium	بيئة إم ١٦
Metamorphesis	التحول اليرقي
Metestrus	مرحلة ما بعد الشبق
Mice strains Balb/c , C57/6J , DBA	سلالة الفئران
Micro-forge	جهاز تشكيل الأنابيب الدقيقة
Microinjector	الحاقن الدقيق
Microinjection	حقن مجهري
Micromanpulatore	جهاز الحقن المجهر
Micropipettes	الأنابيب أو الماصات الدقيقة
Micropipettes grinder	جهاز سن الأنابيب الدقيقة
Micropipette holder	الحامل الدقيق

Micropipitty injection needle	ابر الحقن المجهري
Micropipettes puller	جهاز سحب الأنابيب الدقيقة
Microtome	جهاز التقطيع
Mineral oil	الزيت المعدني
Mitomycine –c MMC	مادة المتومسين س

N

Nuclear transfer	النقل النووي

O

Occipital region	المنطقة القذالية
Omnivorous	متنوعة التغذية
Original ringer solution	محلول رنجر الأصلي
Ova collection	جمع البويضات
Ovens	الأفران

P

Pannet-compton saline solution	مثبت بانت كومبتون الملحي
Peizo injector	جهاز الدقاق (لفتح ثقب في الغشاء الشفاف)
pH meter	جهاز قياس الأس الهيدروجيني
Phosphate buffer solution PBS	محلول الفسفات المتعادل
Pituitary gland	الغدة النخامية
Potassium alaum	الشب البوتاسي

Potassium simple optimize medium KSOM	بيئة البوتاسيوم المتوازنة
Pregnant mare serum gonadotropine PMSG	هرمون سير الفرس الحامل
Proestrous	قبيل الشبق
Pronase	انزيم البرونيز
prostaglandin	هرمون البروستا جلاندين

R

Raffinos	محلول الرفينوس
Rana frog	ضفدعة من جنس رانا
Rabbit-anti mouse-spleen serum	مضاد سيرم الفأر
Redifferentiation	إعادة للتمايز الخلوي
Regeneration	التجدد
Relative humidity	رطوبة نسبية
RPMI medium	بيئة زراعة الخلايا الليفية

S

Sample preservation	حفظ العينات
Sectioning	التقطيع
Semen Analyzer	جهاز تحليل السائل المنوي
Sheep embryo cloning	استنساخ أجنة الأغنام
Slides wormer or Hot plate	سخان الشرائح
Somatic cell preparation	تجهيز الخلايا الجسدية
Space and aeration factor	عامل المكان والتهوية

Sperm collection	جمع الحيوانات المنوية
Standard Holtfreters solution	محلول هولتفرتر القياسي
Stem cell passage	تمرير الخلايا الجذعية
Steinbert's solution	محلول شتاين بيرت
Super ovulation	تنشيط التبويض
Surgical embryo transfer	نقل الأجنة بعملية جراحية
Synthetic oviduct fluid medium (mSOF)	بيئة قناة البيض المحضرة

T

Temperature	الحرارة
Tetracycline	التتراسيكلين
Thowing	الإسالة (التدفئة)
Trophoblast cells	خلايا النسيج الغذائي
Trypsin enzyme	إنزيم التربسين
Two cell stage	طور الخليتين

U

Urodela	الذيليات
UV-light	أشعة فوق بنفسجية

V

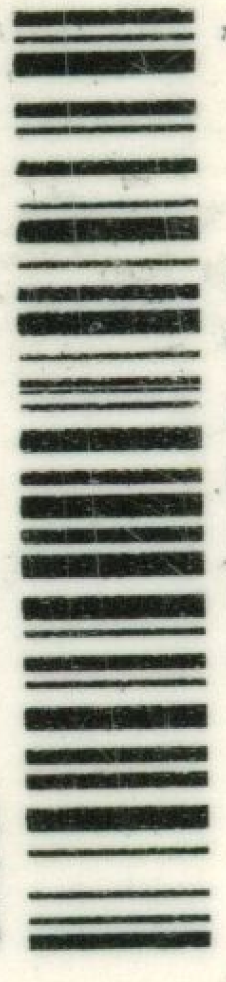
Vaginal plug	السدادة المهبلية
mice male Vasectom	خصي ذكور الفئران
Vascular area	المنطقة الوعائية

Vehicle	المحلول المذيب
Vitelline membrane	الغشاء المحي

W

Water hot bath	الحمام المائي الساخن
Wound healing stage	مرحلة إلتئام الجرح

كشاف الموضوعات



www.ksu.edu.sa

ردمك: ١-٠٥٩-٥٠٧-٦٠٣-٩٧٨
ISBN: 978-603-507-059-1